ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
Α' ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ, ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΠΑΙΔΩΝ «Η ΑΓΙΑ ΣΟΦΙΑ»
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Γ. ΧΡΟΥΣΟΣ

ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΠΝΕΥΜΟΝΙΟΚΟΚΚΙΚΗΣ ΝΟΣΟΥ ΣΤΑ ΠΑΙΔΙΑ. ΕΠΙΠΤΩΣΗ, ΟΡΟΤΥΠΙΑ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΝΤΟΧΗ ΠΡΙΝ ΑΠΟ ΚΑΙ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΩΝ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΩΝ ΠΝΕΥΜΟΝΙΟΚΟΚΚΙΚΩΝ ΕΜΒΟΛΙΩΝ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

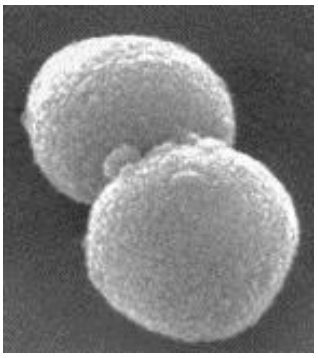
ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ Ι. ΚΟΥΤΟΥΖΗΣ
ΙΑΤΡΟΣ ΒΙΟΠΑΘΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2016

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
Α' ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ, ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΠΑΙΔΩΝ «Η ΑΓΙΑ ΣΟΦΙΑ»
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Γ. ΧΡΟΥΣΟΣ

ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΠΝΕΥΜΟΝΙΟΚΟΚΚΙΚΗΣ ΝΟΣΟΥ ΣΤΑ ΠΑΙΔΙΑ. ΕΠΙΠΤΩΣΗ, ΟΡΟΤΥΠΙΑ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΝΤΟΧΗ ΠΡΙΝ ΑΠΟ ΚΑΙ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΩΝ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΩΝ ΠΝΕΥΜΟΝΙΟΚΟΚΚΙΚΩΝ ΕΜΒΟΛΙΩΝ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ



ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ Ι. ΚΟΥΤΟΥΖΗΣ
ΙΑΤΡΟΣ ΒΙΟΠΑΘΟΛΟΓΟΣ

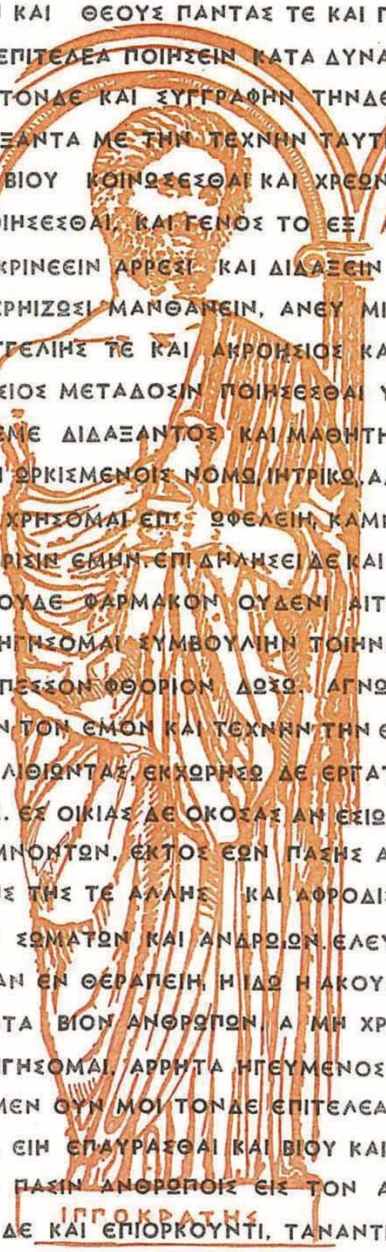
ΑΘΗΝΑ 2016

ΕΘΝΙΚΟΝ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΝ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΝ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΟΡΚΟΣ

ΟΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ, ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΣΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ· ΗΓΗΣΕΣΘΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΕΣΘΑΙ ΚΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΙΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ, ΚΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΕΩΥΤΟΥ ΑΔΕΛΦΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝΕΕΙΝ ΑΡΡΕΣΙ ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ, ΗΝ ΧΡΗΙΖΩΣΙ ΜΑΝΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΣΥΓΓΡΑΦΗΣ, ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣ ΚΑΙ ΤΟΙΣ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝΤΟΣ ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΗΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΩΡΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ ΙΗΤΡΙΚΩ, ΑΛΛΩ ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ. ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙΔΗΛΗΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΙΗ, ΕΙΡΞΕΙΝ. ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ ΟΥΔΕ ΥΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΣΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ· ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ. ΑΓΝΩΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ΟΥ ΤΕΜΕΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘΙΩΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙ ΠΡΗΞΙΟΣ ΤΗΣΔΕ. ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΙΩ, ΕΣΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ'ΩΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΙΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ ΤΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ. Α ΔΕ ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΗ, Η ΙΔΩ Η ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΕΙΗΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΙΣΘΑΙ ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΕΟΝΤΙ, ΚΑΙ ΜΗ ΣΥΓΧΕΟΝΤΙ, ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ, ΠΑΡΑ ΠΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΙΣ ΤΟΝ ΑΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ· ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.

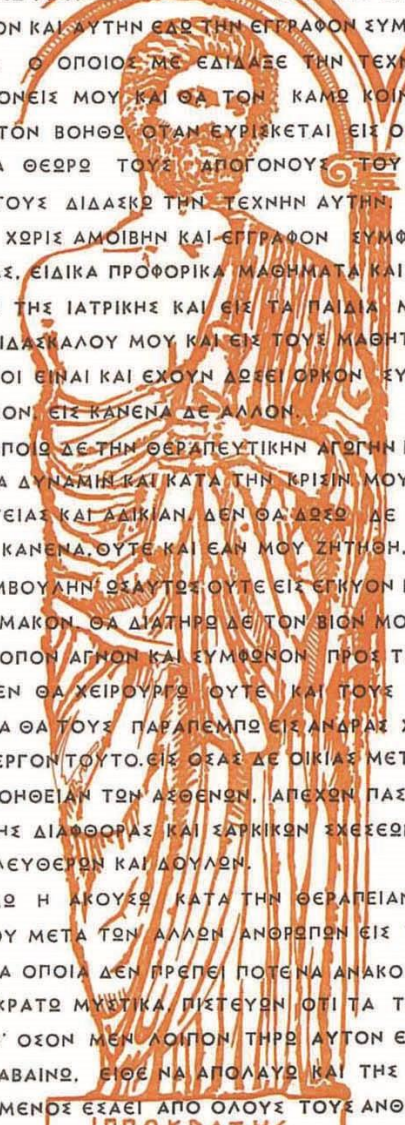


ΟΡΚΟΣ

ΟΡΚΙΖΟΜΑΙ ΕΙΣ ΤΟΝ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΤΟΝ ΙΑΤΡΟΝ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΟΝ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΗΝ ΥΓΕΙΑΝ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΗΝ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ ΚΑΙ ΕΙΣ ΟΛΟΥΣ ΤΟΥΣ ΘΕΟΥΣ ΚΑΙ ΕΙΣ ΟΛΑΣ ΤΑΣ ΘΕΑΣ, ΕΠΙΚΑΛΟΥΜΕΝΟΣ ΑΥΤΟΥΣ ΩΣ ΜΑΡΤΥΡΑΣ, ΟΤΙ ΘΑ ΤΗΡΗΣΩ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΚΡΙΣΙΝ ΜΟΥ ΑΥΤΟΝ ΕΔΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟΝ ΚΑΙ ΑΥΤΗΝ ΕΔΩ ΤΗΝ ΕΓΓΡΑΦΟΝ ΣΥΜΦΩΝΙΑΝ. ΘΑ ΘΕΩΡΩ ΜΕΝ ΕΚΕΙΝΟΝ, Ο ΟΠΟΙΟΣ ΜΕ ΕΔΙΔΑΞΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΑΥΤΗΝ, ΙΣΟΝ ΠΡΟΣ ΤΟΥΣ ΓΟΝΕΙΣ ΜΟΥ, ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΝ ΚΑΜΩ ΚΟΙΝΩΝΟΝ ΤΟΥ ΒΙΟΥ ΜΟΥ ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΝ ΒΟΗΘΩ ΟΤΑΝ ΕΥΡΙΣΚΕΤΑΙ ΕΙΣ ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗΝ ΑΝΑΓΚΗΝ, ΚΑΙ ΘΑ ΘΕΩΡΩ ΤΟΥΣ ΑΠΟΓΟΝΟΥΣ ΤΟΥ ΩΣ ΑΔΕΛΦΟΥΣ ΜΟΥ ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΥΣ ΔΙΔΑΣΚΩ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΑΥΤΗΝ, ΕΑΝ ΘΕΛΟΥΝ ΝΑ ΤΗΝ ΜΑΘΟΥΝ, ΧΩΡΙΣ ΑΜΟΙΒΗΝ ΚΑΙ ΕΓΓΡΑΦΟΝ ΣΥΜΦΩΝΙΑΝ, ΘΑ ΠΑΡΕΧΩ ΔΕ ΣΥΜΒΟΥΛΑΣ, ΕΙΔΙΚΑ ΠΡΟΦΟΡΙΚΑ ΜΑΘΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΟΛΑΣ ΤΑΣ ΥΠΟΛΟΙΠΟΥΣ ΓΝΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΑ ΠΑΙΔΙΑ ΜΟΥ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΑ ΠΑΙΔΙΑ ΤΟΥ ΔΙΔΑΣΚΑΛΟΥ ΜΟΥ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΟΥΣ ΜΑΘΗΤΑΣ, ΟΙ ΟΠΟΙΟΙ ΚΑΙ ΕΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙ ΕΙΝΑΙ ΚΑΙ ΕΧΟΥΝ ΔΩΣΕΙ ΟΡΚΟΝ ΣΥΜΦΩΝΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟΝ ΙΑΤΡΙΚΟΝ ΝΟΜΟΝ, ΕΙΣ ΚΑΝΕΝΑ ΔΕ ΑΛΛΟΝ.

ΘΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩ ΔΕ ΤΗΝ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗΝ ΑΓΩΓΗΝ ΠΡΟΣ ΩΦΕΛΕΙΑΝ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΚΡΙΣΙΝ ΜΟΥ. ΘΑ ΠΡΟΛΑΜΒΑΝΩ ΔΕ ΒΛΑΒΗΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΔΙΚΙΑΝ. ΔΕΝ ΘΑ ΔΩΣΩ ΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΟΝ ΕΙΣ ΚΑΝΕΝΑ, ΟΥΤΕ ΚΑΙ ΕΑΝ ΜΟΥ ΖΗΤΗΘΗ, ΚΑΙ ΟΥΤΕ ΘΑ ΔΩΣΩ ΤΟΙΑΥΤΗΝ ΣΥΜΒΟΥΛΗΝ ΩΣΑΥΤΩΣ, ΟΥΤΕ ΕΙΣ ΕΓΚΥΟΝ ΓΥΝΑΙΚΑ ΘΑ ΔΩΣΩ ΕΚΤΡΩΤΙΚΟΝ ΦΑΡΜΑΚΟΝ. ΘΑ ΔΙΑΤΗΡΩ ΔΕ ΤΟΝ ΒΙΟΝ ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΜΟΥ ΚΑΤΑ ΤΡΟΠΟΝ ΑΓΝΟΝ ΚΑΙ ΣΥΜΦΩΝΟΝ ΠΡΟΣ ΤΟΝ ΘΕΙΟΝ ΝΟΜΟΝ. ΑΚΟΜΗ ΔΕ ΔΕΝ ΘΑ ΧΕΙΡΟΥΡΓΩ ΟΥΤΕ ΚΑΙ ΤΟΥΣ ΠΑΣΧΟΝΤΑΣ ΑΠΟ ΛΙΘΙΑΣΙΝ, ΑΛΛΑ ΘΑ ΤΟΥΣ ΠΑΡΑΠΕΜΠΩ ΕΙΣ ΑΝΔΡΑΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΟΥΣ, ΕΙΔΙΚΟΥΣ ΔΙΑ ΤΟ ΕΡΓΟΝ ΤΟΥΤΟ. ΕΙΣ ΟΣΑΣ ΔΕ ΟΙΚΙΑΣ ΜΕΤΑΒΑΙΝΩ, ΘΑ ΕΙΣΕΡΧΩΜΑΙ ΠΡΟΣ ΒΟΗΘΕΙΑΝ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ, ΑΠΕΧΩΝ ΠΑΣΗΣ ΕΚΟΥΣΙΑΣ ΑΔΙΚΙΑΣ ΚΑΙ ΑΛΛΗΣ ΔΙΑΦΘΟΡΑΣ ΚΑΙ ΣΑΡΚΙΚΩΝ ΣΧΕΣΕΩΝ ΜΕΤΑ ΓΥΝΑΙΚΩΝ Η ΑΝΔΡΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ.

ΟΣΑ ΔΕ ΙΔΩ Η ΑΚΟΥΣΩ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑΝ Η ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΝ ΜΟΥ ΜΕΤΑ ΤΩΝ ΑΛΛΩΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ ΕΙΣ ΤΗΝ ΚΑΘΗΜΕΡΙΝΗΝ ΤΟΥΣ ΖΩΗΝ, ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΔΕΝ ΠΡΕΠΕΙ ΠΟΤΕ ΝΑ ΑΝΑΚΟΙΝΩΘΟΥΝ ΕΙΣ ΤΟΥΣ ΑΛΛΟΥΣ, ΘΑ ΚΡΑΤΩ ΜΥΣΤΙΚΑ, ΠΙΣΤΕΥΩΝ ΟΤΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ ΕΙΝΑΙ ΑΠΟΡΡΗΤΑ. ΕΦ' ΟΣΟΝ ΜΕΝ ΛΟΙΠΟΝ ΤΗΡΩ ΑΥΤΟΝ ΕΔΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟΝ ΚΑΙ ΔΕΝ ΤΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙΝΩ, ΕΙΘΕ ΝΑ ΑΠΟΛΑΥΩ ΚΑΙ ΤΗΣ ΖΩΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΤΕΧΝΗΣ, ΕΚΤΙΜΩΜΕΝΟΣ ΕΣΑΕΙ ΑΠΟ ΟΛΟΥΣ ΤΟΥΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ· ΕΑΝ ΟΜΩΣ ΠΑΡΑΒΩ ΑΥΤΟΝ ΚΑΙ ΓΙΝΩ ΕΠΙΟΡΚΟΣ, ΝΑ ΠΑΘΩ ΤΑ ΑΝΤΙΘΕΤΑ ΤΟΥΤΩΝ.



Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

1. ΠΑΠΑΓΡΗΓΟΡΙΟΥ-ΘΕΟΔΩΡΙΔΟΥ ΜΑΡΙΑ, Ομότιμη Καθηγήτρια Παιδιατρικής Πανεπιστημίου Αθηνών

2. ΤΣΑΚΡΗΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ, Καθηγητής Μικροβιολογίας Πανεπιστημίου Αθηνών

3. ΣΥΡΙΟΠΟΥΛΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΗ, Ομότιμη Καθηγήτρια Παιδιατρικής Πανεπιστημίου Αθηνών

Μέλη Επταμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

1. ΠΑΠΑΓΡΗΓΟΡΙΟΥ-ΘΕΟΔΩΡΙΔΟΥ ΜΑΡΙΑ, Ομότιμη Καθηγήτρια Παιδιατρικής Πανεπιστημίου Αθηνών

2. ΤΣΑΚΡΗΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ, Καθηγητής Μικροβιολογίας Πανεπιστημίου Αθηνών

3. ΣΥΡΙΟΠΟΥΛΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΗ, Ομότιμη Καθηγήτρια Παιδιατρικής Πανεπιστημίου Αθηνών

4. ΔΑΪΚΟΣ Λ. ΓΕΩΡΓΙΟΣ, Καθηγητής Παθολογίας-Λοιμώξεων Πανεπιστημίου Αθηνών

5. ΡΩΜΑ ΕΛΕΥΘΕΡΙΑ, Ομότιμη Καθηγήτρια Παιδιατρικής Πανεπιστημίου Αθηνών

6. ΓΕΝΝΗΜΑΤΑ ΒΑΣΙΛΙΚΗ, Καθηγήτρια Μικροβιολογίας Πανεπιστημίου Αθηνών

7. ΜΙΧΟΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ, Επίκουρος Καθηγητής Παιδιατρικής -Λοιμώξεων Πανεπιστημίου Αθηνών

Στους γονείς μου με αγάπη και ευγνωμοσύνη

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ…… 15

ΠΡΟΛΟΓΟΣ…….. 23

Ι. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ…… 27
2. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΙΟΚΟΚΚΟΥ……. 29

2.1 Ταυτοποίηση και χαρακτηρισμός……...….... 29

2.2 Δομή πνευμονιοκόκκου και λοιμογόνοι παράγοντες……...…….… 30

2.3 Ορότυποι πνευμονιοκόκκου…….. 34

2.3.1 Σύνθεση ελύτρου, ονοματολογία οροτύπων……..... 34

2.3.2 Μέθοδοι προσδιορισμού οροτύπων…….…….…… 36

2.3.3 Ορότυποι που προκαλούν νόσο και γεωγραφική κατανομή…..….... 37

2.4 Μέθοδοι τυποποίησης και προσδιορισμού του γονότυπου *S. pneumoniae* 38

2.4.1 Πολυτοπικός προσδιορισμό ς αλληλουχίας (Multilocus Sequence Typing, MLST)……. 39

3. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ……... 39
4. ΑΝΤΟΧΗ *S. PNEUMONIAE* ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ……... 42

4.1 Εισαγωγή……... 42

4.2 Παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη αντοχής…… 44

4.3 Προσδιορισμός ευαισθησίας στα αντιβιοτικά……... 45

4.4 Σημασία της μικροβιακής αντοχής στην κλινική πράξη……... 48

4.5 Μηχανισμός αντοχής στα β-λακταμικά αντιβιοτικά……. 50

4.6. Αντοχή στις μακρολίδες……... 52

4.6.1 Τροποποίηση του στόχου…….. 53

4.6.2 Μηχανισμός αντλίας εκροής (Efflux Pump)…… 53

4.6.3 Διπλός φαινότυπος…….……... 54

4.7 Αντοχή στις φθοριοκινολόνες…….……... 55

4.7.1 Μοριακοί μηχανισμοί αντοχής στις φθοριοκινολόν…….. 56

4.7.2 Μεταλλάξεις στις δεσμευτικές θέσεις των ενζύμων (Quinolone resistance-determining regions, QRDRs)…….. 57

4.7.3 Μηχανισμός αντοχής αντλίας εκροής (Efflux Pump)……... 57

4.7.4 Οριζόντια μεταφορά γονιδίων και κλωνική διασπορά……..… 58

4.8 Αντοχή στις τετρακυκλίνες…… 58

4.9 Αντοχή στη χλωραμφενικόλη…….. 59
4.10 Αντοχή στην τριμεθοπρίμη/σουλφαμεθοξαζόλη……. 59
4.11 Αντοχή στη ριφαμπικίνη…….. 60
4.12 Αντοχή στις οξαζολιδινόνες…… 60
4.13 Αντοχή στη βανκομυκίνη…… 61
5. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ…….. 61
6. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΜΥΝΑΣ ΤΟΥ ΞΕΝΙΣΤΗ……... 64
6.1 Έμφυτη ανοσία ……...…….. 64
6.2 Επίκτητη ανοσία…… 65
7. ΠΝΕΥΜΟΝΙΟΚΟΚΚΙΚΕΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ……... 65
7.1 Διεισδυτικές λοιμώξεις …….…… 67
7.1.1 Βακτηριαιμία……. 67
7.1.2 Μηνιγγίτιδα……... 67
7.1.3 Πνευμονία…….. 69
7.1.4 Οξεία Μαστοειδίτιδα……...…….. 70
7.1.5 Άλλες διεισδυτικές λοιμώξεις…… 71
7.2 Μη διεισδυτικές ή βλεννογονικές λοιμώξεις…… 71
7.2.1 Μέση πυώδης ωτίτιδα……... 71
7.2.2 Παραρίνοκολπίτιδα……... 72
8. ΕΜΒΟΛΙΑ…… 73
8.1 Πολυσακχαριδικά εμβόλια ……... 73
8.2 Συζευγμένα εμβόλια…….. 76
8.3 Ανάπτυξη νέων εμβολίων…….. 81

ΙΙ. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ……... 85
2. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ…….…….. 87
2.1 Πληθυσμός της μελέτης……..……... 87
2.2 Μικροβιακά στελέχη πνευμονιοκόκκου…… 87
2.3 Ταυτοποίηση στελεχών πνευμονιοκόκκου…… 87
2.4 Οροτυπία στελεχών πνευμονιοκκόκου…….. 88
2.5 Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά……... 90
2.6 Μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης γονιδίων αντοχής…….. 91

2.7 Χαρακτηρισμός στελεχών με τη μέθοδο του πολυτοπικού προσδιορισμού αλληλουχίας (Multilocus Sequence Typing , MLST)…… 92
2.8 Ερευνητικά πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν για τις μοριακές τεχνικές……..…… 92
2.8.1 Πρωτόκολλο εκχύλισης DNA……... 92
2.8.2 Ανίχνευση γονιδίου *lytA* με PCR…….. 93
2.8.3 Ανίχνευση πενικιλλινοδεσμευτικών πρωτεϊνών (γονιδίων *pbp1a, pbp2b, pbp2x* με PCR)…….. 94
2.8.4 Ανίχνευση γονιδίου *erm(*B) με PCR……. 95
2.8.5 Ανίχνευση γονιδίων *mef*(A), *mef*(E) με PCR…… 96
2.8.6 Μέθοδος πολυτοπικού προσδιορισμού αλληλουχίας (Multilocus Sequence Typing, MLST)……. 97
2.8.6.1 Εκχύλιση DNA και PCR…… 97
2.8.6.2 Καθαρισμός των PCR προϊόντων……... 98
2.8.6.3 Μείγμα (master mix) για αλληλούχιση…….. 98
2.8.6.4 Καθαρισμός προϊόντων αλληλούχισης, προσδιορισμός και ανάγνωση αλληλουχιών και τυποποίηση κατά τύπο αλληλουχίας (STs)…….……. 99
2.9 Στατιστική ανάλυση……...…… 100
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ……..…… 101
3.1 Χαρακτηριστικά ασθενών…….. 101
3.2 Επιδημιολογία…… 104
3.3 Ορότυποι…… 107
3.4 Ευαισθησία στα αντιβιοτικά…….. 112
3.5 Μικροβιακή αντοχή και ορότυποι……. 117
3.6 Μηχανισμοί αντοχής…….. 119
3.7 Κλωνικά συμπλέγματα οροτύπου 19A…….. 122
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ…….. 126
5. ΠΕΡΙΛΗΨΗ……... 136
6. SUMMARY……... 139
III. ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ……... 142
IV. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ……... 145

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

1. ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Ονοματεπώνυμο:	Εμμανουήλ Ι. Κουτούζης
Ημερομηνία γέννησης:	7 Απριλίου 1979
Τόπος γέννησης:	Χολαργός Αττικής
Διεύθυνση οικίας:	Σινώπης 37, Αθήνα, 11527
Τηλέφωνο:	6939124998
Ηλεκτρονική διεύθυνση:	koutouzism@yahoo.gr

2. ΣΤΡΑΤΙΩΤΙΚΗ ΘΗΤΕΙΑ

06/11/06 - 25/08/07 295 ΤΕ - Κώς, ΚΕΥΓ- Άρτα, 80 ΜΕΘ - Κώς

3. ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΥΠΑΙΘΡΟΥ

01/02/08 - 18/11/09 Αγροτικό Ιατρείο Αντιμάχειας Κώ Δωδεκανήσου

4. ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ - ΜΕΤΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ - ΔΙΠΛΩΜΑΤΑ

Εγκύκλιες Σπουδές 1997 2^{ο} Λύκειο Καλύμνου, Βαθμός 19 7/11

Προπτυχιακή Εκπαίδευση

1998-2004 Ιατρική Σχολή, του Πανεπιστήμιου Ιατρικής και Φαρμακευτικής «Gr.T.Popa» Ιασίου, Βαθμός: «Άριστα»

05/10/2006 Αναγνώριση Πτυχίου (ΔΟΑΤΑΠ)

20/12/2006 Άδεια Ασκήσεως Ιατρικού Επαγγέλματος, Νομαρχία Δωδεκανήσου, αριθμός 13514/20-12-06

Μεταπτυχιακή Εκπαίδευση

2009-2014 Ειδικότητα Βιοπαθολογίας Νοσοκ. Παίδων «Η Αγία Σοφία», Αθήνα

03/10/2014 Τίτλος ειδικότητας Βιοπαθολογίας

5. ΜΕΛΟΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΕΤΑΙΡΕΙΩΝ

Ελληνικές

Ελληνική Εταιρεία Μικροβιολογίας

Εταιρεία Κλινικής Μικροβιολογίας και Εργαστηριακής Διαγνωστικής

Εταιρεία Πρόληψης και Αντιμετώπισης Λοιμώξεων

Διεθνείς

American Society of Microbiology

International Society of Infectious Diseases

6. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. Daikos GL, Koutsolioutsou A, Tsiodras S, Theodoridou M, **Koutouzis EI,** Charissiadou A, Pangalis A, Michos AG, Chaidopoulou F, Braoudaki M, Syriopoulou VP. Evolution of macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates in the prevaccine era. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008;60(4):393-8.

2. Siahanidou T, Gika G, Skiathitou AV, Oikonomopoulos T, Alexandrou-Athanassoulis H, **Koutouzis EI,** Syriopoulou VP. *Pasteurella multocida* Infection in a neonate: evidence for a human-to-human horizontal transmission. *Pediatr Infect Dis J.* 2012;31(5):536-7.

3. Koutouzi F, Tsakris A, Chatzichristou P, **Koutouzis E,** Kirikou E, Petropoulou N, Daikos GL, Syriopoulou V, Michos A. *Streptococcus pyogenes emm* types and clusters during a 7-year period (2007-2013) in pharyngeal and non-pharyngeal pediatric isolates. *J Clin Microbiol.* 2015;53:2015-21.

4. Koukou D, Chatzichristou P, Trimis G, Siahanidou T, Skiathitou AV, **Koutouzis EI,** Syrogiannopoulos GA, Lourida A, Michos AG, Syriopoulou VP. Rotavirus Gastroenteritis in a Neonatal Unit of a Greek Tertiary Hospital: Clinical Characteristics and Genotypes. *PLoS One* 2015;10:e0133891

5. **Koutouzis EI,** Michos A, Koutouzi FI, Chatzichristou P, Parpounas K, Georgaki A, Theodoridou M, Tsakris A, Syriopoulou VP. Pneumococcal mastoiditis in children before and after the introduction of conjugate pneumococcal vaccines. *Pediatr Infect Dis J.* 2016;35:292-6.

6. Michos A, Koutouzi FI., Tsakris A, Chatzichristou P, **Koutouzis EI,** Daikos GL, Stathi A, Syriopoulou VP. Molecular analysis of *Streptococcus pyogenes* macrolide resistance and virulence genes of pediatric isolates during a 7-year period (2007-2013). *J Antimicrob Chemother.* 2016. [Epub ahead of print]

7. Michos A, Palili A, **Koutouzis EI,** Sandu A, Lykopoulou L, Syriopoulou VP. Detection of bacterial pathogens in synovial and pleural fluid with the Film Array Blood Culture Identification System. *ID Cases* 2016. [Accepted]

8. **Koutouzis EI,** Daikos GL, Chatzichristou P, Michos A, Koutouzi FI, Tsakris A, Charissiadou A, Syriopoulou VP. Evolution of serotype 19A *Streptococcus pneumoniae* among isolates from children in the pre and post conjugate vaccine era. [Submited]

7. ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ

Σε Διεθνή συνέδρια:

1. **Koutouzis EI**, Daikos GL, Roma E, Charissiadou A, Pangalis A, Liakopoulou T, Theodoridou M, Michos A, Syriopoulou VP, *Streptococcus pneumoniae* serotypes before and after introduction of pneumococcal conjugate vaccine in Greece 6th International Symposium on Pneumococci & Pneumococcal Diseases (ISPPD), Reykjavik, Iceland, 8-12 June 2008.

2. Syriopoulou V, Syrogiannopoulos GA, **Koutouzis E,** Tsolia M, Daikos GL, Tsilimigaki A, Kavaliotis J, Roilides E, Galanakis E, Siamopoulou-Mavridou A, Christaki M, Michailidou E, Iosifidis E, Maraki S, Stavrou S, Pangalis A, Papageorgiou K, Saranti-Papasaranti E, Grivea IN, Kafetzis D. Pneumococcal serotypes after the introduction of the heptavalent conjugate vaccine in Greece. 28th Annual meeting of the European Society for Pediatric Infectious Diseases (ESPID), Nice, France, 4-8 May 2010.

3. Stathi A, **Koutouzis E**, Valari M, Chrysaki A, Velegraki A, Pangalis A. Epidemiology of *tinea capitis* in childrens, over a seven years period in great Athens area Greece. 2nd Summer School of the European Society for Pediatrics Dermatology (ESPD), Aegean Sea, 3-6 June 2011.

4. Syriopoulou V, Syrogiannopoulos GA, **Koutouzis E,** Tsolia M, Daikos GL, Georgakopoulou T, Kavaliotis J, Tsilimigaki A, Roilides E, Siamopoulou-Mavridou A, Galanakis E, Michailidou E, Christaki M, Iosifides E, Stavrou S, Maraki S, Charissiadou A, Saranti-Papasaranti E, Menegas D, Grivea IN, Kafetzis D. Serotype distribution and antimicrobial susceptibilities of *S. pneumoniae* following introduction of pneumococcal conjugate vaccines in Greece. 29th Annual meeting of the European Society for Pediatric Infectious Diseases (ESPID), The Hague, Netherlands, 7-11 June 2011.

5. Syriopoulou V, Menegas D, Georgakopoulou T**, Koutouzis E,** Charissiadou A, Chrysaki A, Pangalis A, Theodoridou M, Daikos GL. Pneumococcal disease in children: changing serotypes and antimicrobial resistance in a tertiary hospital in Greece (2002-2011). 8th International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases (ISPPD), Iguacu Falls, Brazil, 12-15 March 2012.

6. Syriopoulou V, Syrogiannopoulos GA, Georgakopoulou T, Tsolia M, Menegas D, **Koutouzis E,** Galanakis E, Kavaliotis J, Tsilimigkaki A, Siamopoulou-Mavridou A, Maraki S, Michailidou E, Christaki M, Stavrou S, Charissiadou A, Roilides E, Daikos GI, Grivea IN, Kafetzis D. Serotype distribution and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* following introduction of 13-valent pneumococcal

conjugate vaccine (PCV13) in Greece. 30th Annual meeting of the European Society for Pediatric Infectious Diseases (ESPID), Thessaloniki, Greece, 8-12 May 2012.

7. Syriopoulou V, Syrogiannopoulos GA, **Koutouzis E,** Menegas D, Tsolia M, Georgakopoulou T, Kavaliotis J, Galanakis E, Roilides E, Siamopoulou-Mavridou A, Chronopoulou G, Charissiadou A, Daikos GL, Grivea IN, Kafetzis D. Epidemiology and antimicrobial susceptibility of *S. pneumoniae* following introduction of pneumococcal conjugate vaccines in Greece. 6th European Scientific Conference on Applied Infectious Disease Epidemiology (ESCAIDE), Edinburgh, Scotland, UK, 24-26 October 2012.

8. Dimitriou E, Moraitou M, **Koutouzis E,** Lianou D, Syriopoulou V, Michelakakis H. Chitotriosidase in Leishmania infection 10th European Working Group on Gaucher Disease, Paris, France, 28 th - 30th June 2012.

9. Syriopoulou V, Syrogiannopoulos GA, **Koutouzis E,** Menegas D, Georgakopoulou T, Galanakis E, Meridis T, Charissiadou A, Daikos GL, Grivea IN, Tsolia M. Serotype evolution and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* 2 years post introduction of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13) in Greece. 31st Annual meeting of the European Society for Pediatric Infectious Diseases (ESPID), Milano, Italy, 28 May - 1 June 2013.

10. Syriopoulou V, Syrogiannopoulos GA, Menegas D, **Koutouzis E,** Georgakopoulou T,. Kavaliotis J, Galanakis E, Siamopoulou-Mavridou A, Tsilimigaki A, Merides T, Roilides E, Daikos GL, Grivea IN, Tsolia M. Serotype evolution and antimicrobial susceptibility of IPD pre and post introduction of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV 13) in Greece. 9th International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases (ISPPD), Hyderabad, India, 9-13 March 2014.

11. Syriopoulou V, Menegas D, **Koutouzis E,** Grivea IN, Charissiadou A, Georgakopoulou T, Kavaliotis J, Galanakis E, Daikos GL, Syrogiannopoulos SA. Serotype evolution and antimicrobial susceptibility of pneumococcal AOM pre and post introduction of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV 13) in Greece. 32nd Annual meeting of the European Society for Pediatric Infectious Diseases (ESPID), Dublin, Ireland, 6-10 May 2014.

12. Michos A, Koutouzi FI, Tsakris A, Chatzichristou P, **Koutouzis EI,** Daikos GL, Stathi A, Syriopoulou VP. Molecular analysis of *Streptococcus pyogenes* macrolide resistance, *emm* types and virulence genes of pediatric isolates during a 7-Year period. ASM Microbe (ASM), Boston, USA, 16-20 June 2016.

Σε Ελληνικά Συνέδρια:

1. Πετρίδου Ε, Ιορδάνου Π, **Κουτούζης Ε**, Κοντογιάννη Β, Χαρισιάδου Α, Γιαννάκη-Ψινάκη Μ. Αντισώματα έναντι *Bordetella pertussis* σε αιμοδότες. 5° Πανελλήνιο Συνέδριο Ελέγχου Λοιμώξεων, Αθήνα, 8-9 Νοεμβρίου 2012.

2. Χρονοπούλου Γ, **Κουτούζης Ε**, Καβαρνού Γ, Κατζηλιεράκης Ε, Δαΐκος Γ, Συριοπούλου Β, Τριανταφύλλου Ε, Αγραφιώτη Κ, Λιακοπούλου Θ. Οροτυπία στελεχών *Streptococcus pneumoniae* από αιμοκαλλιέργειες παιδιατρικού πληθυσμού κατά τη διάρκεια μιας εννεαετίας. 6° Εθνικό Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας & Νοσοκομειακών Λοιμώξεων, Αθήνα, 27-28 Φεβρουαρίου & 1 Μαρτίου 2013.

3. Πετρίδου Ε, **Κουτούζης Ε**, Ιορδάνου Π, Στάθη Α, Κοντογιάννη Β, Γιαννάκη Μ, Πάγκαλη Α. Εργαστηριακή διάγνωση κοκκύτη σε παιδιατρικό πληθυσμό. 6° Εθνικό Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας & Νοσοκομειακών Λοιμώξεων, Αθήνα, 27-28 Φεβρουαρίου & 1 Μαρτίου 2013.

4. Κοτρώτσου Θ, Ρόκα Κ, Σκευάκη Χ, Καλαμπαλίκης Π, Πετροπούλου Ν, Φλίγγερ Ι, **Κουτουζης Ε**, Αλεξάνδρου-Αθανασούλη Ε, Χαρισιάδου Α. Αεριογόνος γάγγραινα ή κλωστηριδιακή μυονέκρωση απο *Clostridium perfrigens* σε παιδί με παραμελημένο βαθύ θλαστικό τραυματισμό. 6° Εθνικό Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας & Νοσοκομειακών Λοιμώξεων, Αθήνα, 27-28 Φεβρουαρίου & 1 Μαρτίου 2013.

5. Κοτρώτσου Θ, Στάθη Α, Μυλωνά Σ, Ιορδάνου Π, **Κουτούζης Ε**, Λιάτσης Ε, Μπέλλου Μ, Χαρισιάδου Α, Χρυσάκη Α. Ακτινομυκητίαση στο λάρυγγα παιδιού με πρωτοπαθή ανοσοανεπάρκεια και λεμφοματοειδή κοκκιωμάτωση. 6° Εθνικό Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας & Νοσοκομειακών Λοιμώξεων, Αθήνα, 27-28 Φεβρουαρίου & 1 Μαρτίου 2013.

6. Πετρίδου Ε, Σκευάκη Χ, **Κουτούζης Ε**, Ιορδάνου Π, Κοντογιάννη Β, Μίχος Α. Αναζήτηση *Bordetella holmesii* σε παιδιατρικό πληθυσμό. 7° Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας, Αθήνα, 25-27 Φεβρουαρίου 2015.

8. ΣΥΝΕΔΡΙΑ

Παρακολούθηση Διεθνών συνεδρίων:

1. 43rd Annual Meeting of Infectious Diseases Society of America (IDSA) October 6-7 , 2005 - San Francisco, USA
2. 44th Annual Meeting of Infectious Diseases Society of America (IDSA) October 12-15, 2006 - Toronto, Ontario, Canada
3. 47th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC) September 17-20, 2007 - Chicago, USA
4. 5th World Congress of the World Society for Pediatrics Infectious Diseases (WSPID) November 15-18, 2007 - Bangkok, Thailand
5. 6th International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases (ISPPD) June 8-12, 2008 - Reykjavik, Iceland
6. 48th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC) /44th Annual Meeting of Infectious Diseases Society of America (IDSA) October 25-28, 2008 - Washington DC, USA
7. 1st Pneumococcal Conjugate Vaccines Summit: Bridging to the Future, November 16-18, 2008 - Istanbul, Turkey
8. 19th European Congress Of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, (ECCMID) May 16-19, 2009 - Helsinki, Finland
9. 4th Europaediatrics, Congress of the European Paediatric Association, (EPA) July 3-6, 2009 - Moscow, Russia
10. 2nd Pneumococcal Conjugate Vaccines Summit: Bridging to the Future, November 13-14, 2009 - Rome, Italy
11. 6th World Congress of the World Society for Pediatrics Infectious Diseases (WSPID) November 18-22, 2009 - Buenos Aires, Argentina
12. 7th International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases (ISPPD) March 14-18, 2010 - Tel Aviv, Israel
13. 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) April 10-13, 2010 - Vienna, Austria
14. 50th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC) September 12-15, 2010 - Boston, USA
15. 3rd Pneumococcal Conjugate Vaccines Summit: Bridging to the Future, November 18-19, 2010 - Barcelona, Spain

16. 21st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) / 27th International Congress of Chemotherapy (ICC), May 7-10, 2011 - Milan, Italy

17. 2nd Summer School of the European Society for Paediatric Dermatology (ESPD) June 3-6, 2011 - Aegean Sea

18. 8th International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases (ISPPD) March 11-15, 2012 - Iguacu Falls, Brazil

19. 52nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC) September 9-12, 2012 – San Francisco, USA

20. 23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) April 27-30, 2013 - Berlin, Germany

21. 53rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC) September 10-13, 2013 - Denver, USA

22. 25th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) April 25-28, 2015 - Copenhagen, Denmark

Παρακολούθηση Ελληνικών συνεδρίων και ημερίδων:

1. 7η Επιστημονική Ημερίδα «Ιογενείς Λοιμώξεις», 20-21 Ιανουαρίου 2006, Αθήνα, Divani Caravel Hotel

2. Επιστημονική εκδήλωση Ελληνικού Κολεγίου Παιδιάτρων, 8-10 Σεπτεμβρίου, 2006, Μύκονος

3. 8ο Πανελλήνιο Συνέδριο Λοιμώξεων και 1η ημερίδα Χημειοθεραπείας, 9-11 Φεβρουαρίου 2007, Αθήνα, Divani Caravel Hotel

4. 45ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, 25-27 Μαΐου 2007, Χαλκιδική, Porto Carras

5. 9ο Πανελλήνιο Συνέδριο Λοιμώξεων και 1η ημερίδα Χημειοθεραπείας, 9-11 Φεβρουαρίου 2007, Αθήνα, Divani Caravel Hotel

6. 4ο Εθνικό Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας & Νοσοκομειακών Λοιμώξεων, 12-14 Φεβρουαρίου 2009, Αθήνα, Πολεμικό Μουσείο

7. 10η Ημερίδα Κλινικής Μικροβιολογίας, 23 Ιανουαρίου 2010, Αθήνα, Αμφιθέατρο Πολεμικού Μουσείου

8. 3η Μετεκπαιδευτική Ημερίδα Παιδιατρικών Λοιμώξεων, 13 Νοεμβρίου 2010, Αθήνα, Αμφιθέατρο Χωρεμείου Ερευνητικού Εργαστηρίου

9. 11η Ημερίδα Κλινικής Μικροβιολογίας, 22 Ιανουαρίου 2011, Αθήνα, Αμφιθέατρο 251 Γενικού Νοσοκομείου Αεροπορίας

10. 5° Εθνικό Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας & Νοσοκομειακών Λοιμώξεων, 10-12 Φεβρουαρίου 2011, Αθήνα, Μέγαρο Διεθνές Συνεδριακό Κέντρο Αθηνών

11. 4^{η} Μετεκπαιδευτική Ημερίδα Παιδιατρικών Λοιμώξεων, 12 Νοεμβρίου 2011, Αθήνα, Αμφιθέατρο Χωρεμείου Ερευνητικού Εργαστηρίου

12. 12^{η} Ημερίδα Κλινικής Μικροβιολογίας, 21 Ιανουαρίου 2012, Αθήνα, Αμφιθέατρο 251 Γενικού Νοσοκομείου Αεροπορίας

13. 7° Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας, 15-17 Μαρτίου 2012, Αθήνα, Μέγαρο Διεθνές Συνεδριακό Κέντρο Αθηνών

14. 5° Πανελλήνιο Συνέδριο Ελέγχου Λοιμώξεων, 8-9 Νοεμβρίου 2012, Αθήνα, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών

15. 5^{η} Μετεκπαιδευτική Ημερίδα Παιδιατρικών Λοιμώξεων, 17 Νοεμβρίου 2012 Αθήνα, Αμφιθέατρο Χωρεμείου Ερευνητικού Εργαστηρίου

16. 13^{η} Ημερίδα Κλινικής Μικροβιολογίας, 19 Ιανουαρίου 2013, Αθήνα, Αμφιθέατρο 251 Γενικού Νοσοκομείου Αεροπορίας

17. 23^{η} Συνεδριακή Επιστημονική Εκδήλωση Ελληνικής Εταιρείας Εργαστηριακής Αιματολογίας και Αιμοδοσίας, 23 Μαΐου 2013, Αθήνα, Hilton Hotel

18. 6^{η} Μετεκπαιδευτική Διημερίδα Παιδιατρικών Λοιμώξεων, 15-16 Νοεμβρίου 2013, Αθήνα, Αμφιθέατρο Χωρεμείου Ερευνητικού Εργαστηρίου

19. 6° Εθνικό Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας & Νοσοκομειακών Λοιμώξεων, 27-28 Φεβρουαρίου & 1 Μαρτίου 2013, Αθήνα, Royal Olympic Hotel

20. 14^{η} Ημερίδα Κλινικής Μικροβιολογίας, 25 Ιανουαρίου 2014, Αθήνα, Αμφιθέατρο 251 Γενικού Νοσοκομείου Αεροπορίας

21. 8° Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας, 29-31 Μαΐου 2014, Αθήνα, Μέγαρο Διεθνές Συνεδριακό Κέντρο Αθηνών

22. 7^{η} Μετεκπαιδευτική Ημερίδα Παιδιατρικών Λοιμώξεων, 1 Νοεμβρίου 2014, Αθήνα, Αμφιθέατρο Χωρεμείου Ερευνητικού Εργαστηρίου

23. 8° Πανελλήνιο Συνέδριο Ιολογίας, 27-28 Φεβρουαρίου 2015, Αθήνα, Αμφιθέατρο Πολεμικού Μουσείου

24. 8^{η} Μετεκπαιδευτική Διημερίδα Παιδιατρικών Λοιμώξεων, 14 Νοεμβρίου 2015, Αθήνα, Αμφιθέατρο Χωρεμείου Ερευνητικού Εργαστηρίου

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ο πνευμονιόκοκκος ή στρεπτόκοκκος της πνευμονίας *(Streptococcus pneumoniae*) από το 1881 που ανακαλύφθηκε μέχρι σήμερα, παρά τις πολλές σημαντικές εξελίξεις της ιατρικής επιστήμης και την ορθότερη αντιμετώπιση των ασθενών, με την ανακάλυψη και χρήση δραστικών αντιβιοτικών και εμβολίων, εξακολουθεί να ευθύνεται για σημαντική νοσηρότητα και θνητότητα καθώς και οικονομική επιβάρυνση. Είναι υπεύθυνος για πολλές σοβαρές διεισδυτικές και μη διεισδυτικές λοιμώξεις, κυρίως σε παιδιά, αλλά και ενήλικες, όπως μηνιγγίτιδα, μικροβιαιμία, πνευμονία, οξεία μέση πυώδη ωτίτιδα, μαστοειδίτιδα παραρρινοκολπίτιδα και σπανιότερα άλλες. Η ανάπτυξη αντοχής του μικροβίου στα β-λακταμικά αντιβιοτικά και άλλες ομάδες αντιβιοτικών, η οποία συνεχώς αυξάνει σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, προβληματίζει στην αντιμετώπιση των λοιμώξεων από πολυανθεκτικά στελέχη πνευμονιοκόκκου.

Η πρόληψη των πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων αποτέλεσε αντικείμενο έρευνας πολλών δεκαετιών. Ο μεγάλος αριθμός οροτύπων του μικροβίου αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα παρασκευής αποτελεσματικού εμβολίου για την πρόληψη της πνευμονιοκοκκικής νόσου. Τα διαθέσιμα πνευμονιοκοκκικά εμβόλια, τα οποία παρασκευάστηκαν από οροτύπους που συχνότερα προκαλούν νόσο στα παιδιά, μείωσαν τη νόσηση από τους οροτύπους του πνευμονιοκόκκου που περιλαμβάνονται σε αυτά, συνέβαλαν όμως στην ανάδυση νέων παθογόνων οροτύπων και μάλιστα πολυανθεκτικών στα αντιβιοτικά.

Για τους λόγους αυτούς, το ερευνητικό ενδιαφέρον της μελέτης των πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων, συνεχίζεται σε παγκόσμιο επίπεδο και αφορά στην επίπτωση, επιδημιολογία, παθογένεια, αντιμετώπιση και πρόληψη. Η ανάπτυξη νέων μοριακών τεχνικών συνέβαλλε στον καλύτερο χαρακτηρισμό των στελεχών, στην περαιτέρω μελέτη της παθογένειας της νόσου και στη διασαφήνιση ορισμένων μηχανισμών αντοχής τους στα αντιβιοτικά. Η διαχρονική μελέτη της εξέλιξης της πνευμονιοκοκκικής νόσου είναι απαραίτητη σε κάθε χώρα και γεωγραφική περιοχή για τη στρατηγική που πρέπει να ακολουθείται όσον αφορά στην αντιμετώπιση και πρόληψή της. Στην παρούσα έρευνα αναλύθηκαν δεδομένα 30 ετών από το Νοσοκομείο Παίδων «Η Αγία Σοφία» το οποίο εξυπηρετεί περίπου το 40% του παιδικού πληθυσμού της ευρύτερης περιοχής της Αττικής. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η επίπτωση της πνευμονιοκοκκικής νόσου στα παιδιά, οι ορότυποι που ευθύνονται για τις διεισδυτικές και μη διεισδυτικές λοιμώξεις, η μικροβιακή

αντοχή στα αντιβιοτικά, οι κυριότεροι μηχανισμοί που προσδίδουν αντοχή στην πενικιλλίνη και τις μακρολίδες, καθώς και ο γενετικός χαρακτηρισμός επιλεγμένων στελεχών.

Ολοκληρώνοντας τη μελέτη αυτή θα ήθελα να εκφράσω θερμότατες ευχαριστίες σε όλους εκείνους που με βοήθησαν να την πραγματοποιήσω. Πρώτα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Γεώργιο Χρούσο, Διευθυντή της Α' Παιδιατρικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών που μου έδωσε τη δυνατότητα να πραγματοποιήσω τη μελέτη αυτή στο Τμήμα Λοιμώξεων και Χημειοθεραπείας της Α' Παιδιατρικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, στο Χωρέμειο Ερευνητικό Εργαστήριο.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στην Ομότιμη Καθηγήτρια Παιδιατρικής του Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Μαρία Παπαγρηγορίου Θεοδωρίδου για τον καθοδηγητικό της ρόλο τόσο κατά την πορεία όσο και την συγγραφή της διατριβής. Θερμές ευχαριστίες εκφράζω επίσης στον Καθηγητή Μικροβιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Αθανάσιο Τσακρή για την καθοδήγησή του σε όλα τα στάδια της μελέτης. Για την επιλογή του θέματος και τις πολύτιμες υποδείξεις κατά την πρόοδο της έρευνας εκφράζω ευγνωμοσύνη στην Ομότιμη Καθηγήτρια Παιδιατρικής του Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Βασιλική Συριοπούλου και στον Καθηγητή Παθολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Γεώργιο Λ. Δαΐκο, ο οποίος εκτός των άλλων με βοήθησε σημαντικά στη στατιστική ανάλυση και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

Ευχαριστώ επίσης θερμά τις Διευθύντριες του Μικροβιολογικού Εργαστηρίου του Νοσοκομείου Παίδων «Η Αγία Σοφία», την κ. Αναστασία Πάγκαλη και την κ. Αθηνά Χαρισιάδου, όπως και όλους τους συναδέλφους μου Βιοπαθολόγους ιδιαίτερα την κ. Ελένη Κηρύκου και την κ. Νίκη Πετροπούλου, καθώς επίσης και τη Βιολόγο κ. Αγγελική Στάθη για την βοήθειά τους στη συλλογή του υλικού. Τέλος θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες στο προσωπικό του Τμήματος Λοιμώξεων και Χημειοθεραπείας. Πρώτα στον Επίκουρο Καθηγητή Παιδιατρικής κ. Αθανάσιο Μίχο και ακολούθως στον Βιοπαθολόγο κ. Τριαντάφυλλο Συριόπουλο και ιδιαίτερα στην Βιολόγο κ. Παναγιώτα Χατζηχρήστου για την πρόθυμη συνεργασία τους στο εργαστηριακό μέρος της μελέτης.

Ι. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στα τέλη του δέκατου ένατου αιώνα για πρώτη φορά, ταυτόχρονα αλλά ανεξάρτητα, ο Louis Pasteur στη Γαλλία και ο George Sternberg στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής (ΗΠΑ), απομόνωσαν τον πνευμονιόκοκκο σε καλλιέργεια αίματος κονίκλων που είχαν μολυνθεί μετά από υποδόρια ένεση ανθρωπίνου σιέλου. Τα ευρήματά τους δημοσιεύθηκαν το 1881, πρώτα από τον Pasteur και αρκετούς μήνες αργότερα από τον Sternberg. Ο σημαντικός ρόλος του μικροβίου αυτού για την ανθρώπινη νοσηρότητα δεν είχε εκτιμηθεί όταν ανακαλύφθηκε. Το 1886 όταν ο μικροοργανισμός αυτός ονομάσθηκε "*pneumokokkus*" είχε αναγνωριστεί από πολλούς ανεξάρτητους ερευνητές και ο ρόλος του στην αιτιολογία της πνευμονίας ήταν γνωστός. Το 1920 λόγω της μορφολογίας του ονομάσθηκε "*Diplococcus pneumoniae*", το οποίο άλλαξε σε "*Streptococcus pneumoniae*" το 1974 λόγω της ομοιότητάς του με άλλους στρεπτοκοκκόκους (Austrian, 1981).

Το 1897, οι Bezanc και Griffon, Γάλλοι ερευνητές απέδειξαν την ύπαρξη πολλών οροτύπων του πνευμονιοκόκκου, ενώ το 1910 στη Γερμανία οι Neufeld και Handel παρασκεύασαν υψηλής δραστικότητας μονοδύναμους αντιορούς μετά από ανοσοποίηση κονίκλων και ίππων με στελέχη που απομονώθηκαν από ασθενείς με πνευμονία, με σκοπό να χρησιμοποιηθούν στη θεραπεία πασχόντων από πνευμονία (Austrian, 1981).

Ακολούθησε σημαντική έρευνα τόσο για την μελέτη του μικροβίου, την παθογένεια της νόσου και κυρίως για την παρασκευή εμβολίου για την πρόληψη των πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων. Η πρώτη προσπάθεια πρόληψης της πνευμονιοκοκκικής πνευμονίας έγινε το 1911 από τους Wright και συν., οι οποίοι εμβολίασαν με νεκρά μικρόβια πνευμονιοκόκκου μεταλλωρύχους χρυσού στη Ν. Αφρική, άτομα ιδιαίτερα ευπαθή στις πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις. Η προσπάθεια αυτή είχε καλά αποτελέσματα και οδήγησε στη συνέχιση της έρευνας για την παρασκευή πνευμονιοκοκκικού εμβολίου.

Σταθμό για την παρασκευή του εμβολίου αποτέλεσε το 1930 η διαπίστωση από τους Francis και Tillett, ότι κεκαθαρμένοι πολυσαγχαρίτες του ελύτρου (κάψας) του πνευμονιόκοκκου έχουν αντιγονική δράση στους ανθρώπους και προκαλούν την παραγωγή ειδικών αντισωμάτων. Το 1938 ο Felton διαπίστωσε κλινική προστασία ειδική για κάθε ορότυπο σε ανθρώπους που χορηγήθηκε κεκαθαρμένος πολυσακχαρίτης του ελύτρου (Felton, 1938). Η ανακάλυψη αυτή οδήγησε στην παρασκευή και κλινική εφαρμογή πολυσακχαριδικής προέλευσης εμβολίων με συνδυασμό δύο, τεσσάρων ή και έξι αντιγόνων

διαφορετικών οροτύπων πνευμονιοκόκκου, δύο από τα οποία (6-δύναμα) κυκλοφόρησαν στις ΗΠΑ μετά το 2^{ο} παγκόσμιο πόλεμο (MacLeod και συν., 1945).

Η ευρεία όμως χρήση της πενικιλλίνης, κατά την ίδια περίοδο, μείωσε το ενδιαφέρον για την πρόληψη των πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων, με αποτέλεσμα να διακοπεί και η παραγωγή του εμβολίου. Δεκαπέντε όμως χρόνια αργότερα, οι Austrian και συν. επεσήμαναν ότι η αυξημένη νοσηρότητα και θνητότητα στις πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις παρέμενε. Το γεγονός αυτό καθώς και η απομόνωση ανθεκτικών στην πενικιλλίνη στελεχών αναζωπύρωσαν το ενδιαφέρον για παρασκευή εμβολίου (Austrian, 1964).

Έτσι στα μέσα της δεκαετίας του 1970 παρασκευάζονται εμβόλια με συνδυασμό πολυσακχαριτών και μετά την κλινική εφαρμογή 8-δύναμου, 12-δύναμου και 13-δύναμου εμβολίου (Austrian, 1976, Austrian, 1977a), κυκλοφόρησε το 1977 στις ΗΠΑ το 14-δύναμο πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο (Pneumovax, Merck Sharp & Dohme). Ακολούθησε η σύνθεση του 23-δυνάμου εμβολίου που κυκλοφόρησε το 1983 στις ΗΠΑ (Pneumovax 23, Merck Sharp & Dohme, Pnu-Imune 23, Lederle). (Austrian, 1977b, CDC, 1984).

Η διαπίστωση ότι βρέφη και μικρά παιδιά ανταποκρίνονται ανεπαρκώς στα πολυσακχαριδικά εμβόλια, τα οποία προκαλούν αντισωματική απάντηση που δεν εξαρτάται από τα Τ λεμφοκύτταρα, οδήγησε στην ανάπτυξη μιας άλλης κατηγορίας εμβολίων, των συζευγμένων με πρωτεΐνες. Τα συζευγμένα εμβόλια (7-δύναμο, 10-δύναμο και 13-δύναμο) ήταν αποτελεσματικά για βρέφη και μικρά παιδιά κάτω των πέντε ετών όπου εφαρμόστηκαν και μείωσαν τη νοσηρότητα από τους οροτύπους που περιείχαν (Black και συν., 2000, 2002a, 2002b, Whitney και συν., 2006).

Παρά τη διάθεση αποτελεσματικών εμβολίων και αντιβιοτικών, οι διεισδυτικές και μη πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις στα παιδιά και τους ενήλικες εξακολουθούν να προβληματίζουν. Ο μεγάλος αριθμός των οροτύπων του μικροβίου, η ανάδυση νέων παθογόνων οροτύπων μετά την εφαρμογή των εμβολίων και η ανάπτυξη αντοχής στα αντιβιοτικά συμβάλλουν στη συνεχή νοσηρότητα και θνητότητα από τις λοιμώξεις αυτές και καθιστούν το ενδιαφέρον των ερευνητών αμείωτο για την μελέτη των πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων καθώς και αναγκαία τη συνεχή επιτήρηση της νόσου, αντικείμενα που πραγματεύεται και η παρούσα έρευνα.

2. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΙΟΚΟΚΚΟΥ

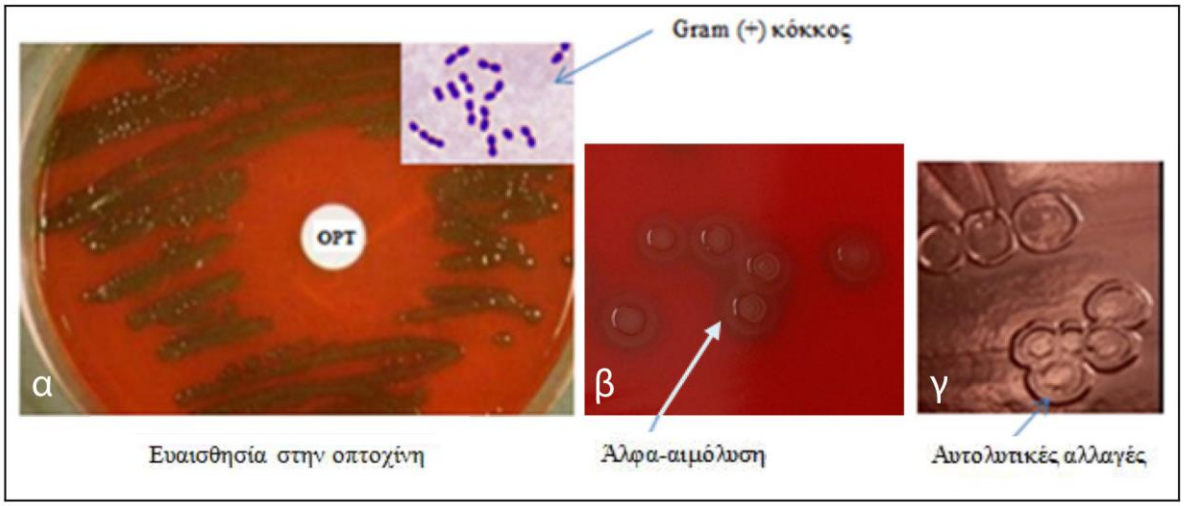
2.1 Ταυτοποίηση και χαρακτηρισμός

Ο πνευμονιόκοκκος είναι Gram-θετικός, λογχοειδής διπλόκοκκος, διαμέτρου 0,5-1,25 μm, ο οποίος αναπτύσσεται ενδοκυττάρια ή εξωκυττάρια, μεμονωμένος ή σε βραχείες αλυσίδες. Είναι απαιτητικό βακτήριο, αναπτύσσεται καλύτερα στους 35-37°C παρουσία ~5% CO2 (ή σε δοχείο με αναμμένο κερί). Ο μικροοργανισμός αυτός είναι καταλάση αρνητικός, αλλά παράγει υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) μέσω ενός συστήματος φλαβοενζύμου και ως εκ τούτου αναπτύσσεται καλύτερα με την παρουσία μιας πηγής καταλάσης, όπως είναι τα ερυθρά αιμοσφαίρια, γι' αυτό καλλιεργείται σε υλικά που περιέχουν αίμα (αιματούχα και σοκολατούχα τρυβλία). Η μορφολογία των αποικιών του πνευμονιοκόκκου στο αιματούχο άγαρ ποικίλει και εξαρτάται από το βαθμό της παραγωγής ελύτρου (κάψας). Συνήθως είναι μικρές, χρώματος γκρι, υγρές και μερικές φορές μεγάλες, μερικά χιλιοστά σε διάμετρο και πολύ βλεννώδεις. Οι μεγάλες βλεννώδεις αποικίες παρατηρούνται σχεδόν κατ' εξοχήν στις καλλιέργειες του οροτύπου 3. Οι αποικίες του πνευμονιοκόκκου παράγουν πνευμονιολυσίνη (παλαιότερα ονομαζόταν α-αιμολυσίνη), η οποία διασπά την αιμοσφαιρίνη σε μια πράσινη χρωστική ουσία με αποτέλεσμα, οι αποικίες του πνευμονιοκόκκου να περιβάλλονται από πράσινη ζώνη (α-αιμόλυση) κατά την ανάπτυξή του σε τρυβλία με αιματούχο άγαρ (Εικόνα1).

Η άλφα-αιμολυτική ιδιότητα διαφοροποιεί το βακτήριο αυτό από πολλά άλλα είδη μικροβίων, αλλά όχι από τους άλφα-αιμολυτικούς στρεπτόκοκκους (viridans) που βρίσκονται στη χλωρίδα του στόματος. Η διαφοροποίηση των πνευμονιοκόκκων από τους πρασινίζοντες στρεπτοκόκκους είναι δύσκολο όταν οι αποικίες είναι νεαρές στα πρώτα στάδια της ανάπτυξης. Ωστόσο, μετά από επώαση 24-48 ωρών οι αποικίες του πνευμονιοκόκκου εμφανίζονται πεπλατυσμένες με μικρό κοίλωμα στο κεντρικό τμήμα (Εικόνα 1). Η παρατήρηση με μεγεθυντικό φακό των αποικιών του πνευμονιοκόκκου βοηθά στη διαφοροποίησή τους από τους πρασινίζοντες στρεπτοκόκκους.

Η ταυτοποίηση του πνευμονιοκόκκου γίνεται με τις ακόλουθες δοκιμασίες: 1) α-αιμόλυση σε αιματούχο άγαρ, 2) ευαισθησία στην οπτοχίνη, 3) χρώση κατά Gram (Gram θετικός κόκκος), 4) αρνητική δοκιμασία καταλάσης και 5) διαλυτότητα στα χολικά άλατα (Εικόνα 2). Η ανάπτυξη του πνευμονιοκόκκου αναστέλλεται από την αιθυλική υδροκουπρεΐνη (optochin), σε μικρό ποσοστό όμως ανθεκτικών στην οπτοχίνη πνευμονιοκόκκων τα κύτταρά του υποβάλλονται σε λύση με χολικά άλατα ή καλύτερα σε

ανίχνευση του γονιδίου της αυτολυσίνης *lytA* με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), που είναι ιδιαίτερα αξιόπιστη.



Εικόνα 1. Καλλιέργεια πνευμονιοκόκκου σε αιματούχο άγαρ. α) Μορφολογία αποικιών, ευαισθησία στην οπτοχίνη, β) Άλφα αιμόλυση και γ) Μορφολογία αποικιών μετά από αυτολυτικές αλλαγές.

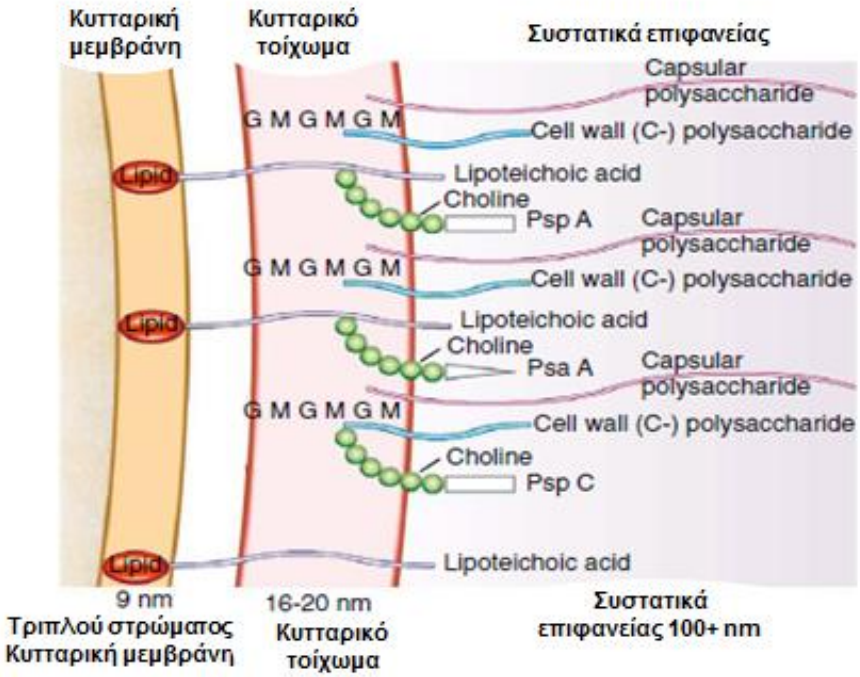
Εικόνα 2. Δοκιμασίες ταυτοποίησης πνευμονιοκόκκου, α) Gram χρώση, β) Δοκιμασία καταλάσης (απουσία φυσαλίδων δείχνει αρνητική δοκιμασία) και γ) Δοκιμασία διαλυτότητας στα άλατα χολής (το διαυγές σωληνάριο δείχνει το θετικό αποτέλεσμα).

2.2 Δομή πνευμονιοκόκκου και λοιμογόνοι παράγοντες

Ο πνευμονιόκοκκος, όπως και άλλα Gram-θετικά βακτήρια, γύρω από την κυτταρική μεμβράνη φέρει σύνθετο κυτταρικό τοίχωμα, το οποίο έχει δύο κύριες λειτουργίες. Προστατεύει το κύτταρο από λύση λόγω της εσωτερικής σπαργής και διατηρεί το σχήμα του κυττάρου (Vollmer, 2008). Το κυτταρικό τοίχωμα περιβάλλεται από έλυτρο (κάψα) πολυσακχαριδικής χημικής σύνθεσης (Εικόνα 3). Η κάψα προστατεύει τον πνευμονιόκοκκο γιατί εμποδίζει τη φαγοκυττάρωσή του από τα κύτταρα του ξενιστή απουσία ειδικών

αντισωμάτων και είναι αναμφισβήτητα καθοριστικός λοιμογόνος παράγοντας του μικροβίου (Janoff και Musher, 2015, Lindberg και συν., 1980).

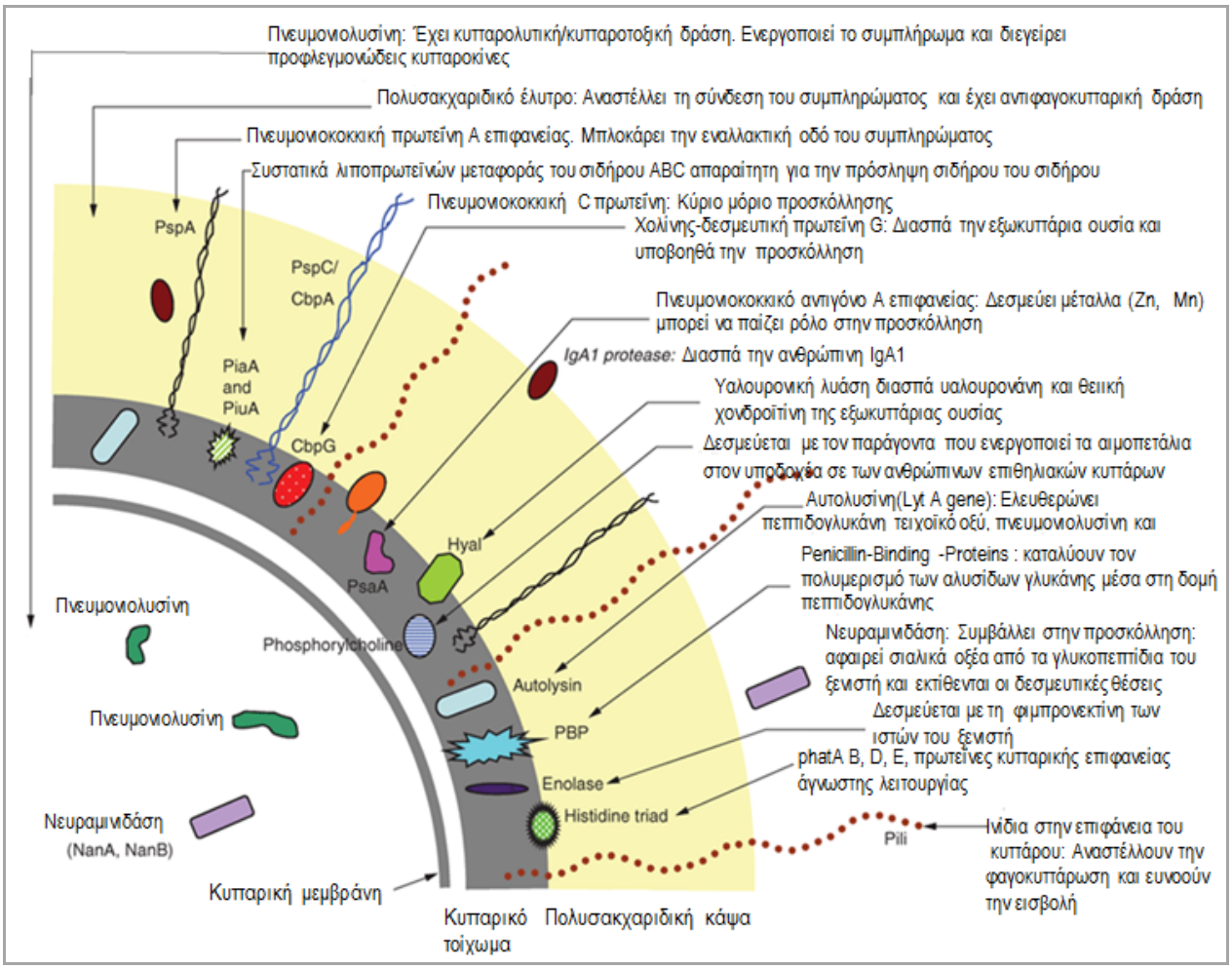
Τα κύρια συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος του πνευμονιοκόκκου είναι η πεπτιδογλυκάνη και το τειχοϊκό οξύ (Sorensen, 1995). Η πεπτιδογλυκάνη αποτελείται από μακρές εναλλασσόμενες αλύσους N-ακετυλο-D-γλυκοζαμίνης και N-ακετυλομουραμικού οξέος, από τις οποίες εκτείνονται οι άλυσοι τεσσάρων έως έξι αμινοξέων που αποτελούν τα κύρια ή στελεχιακά πεπτίδια (Εικόνα 3). Τα πεπτίδια αυτά συνδέονται με γέφυρες της πενταγλυκίνης και δημιουργούν ισχυρό κυτταρικό τοίχωμα (Garcia-Bustos και συν., 1987, Vollmer και συν., 2008). Το τειχοϊκό οξύ, συστατικό της εξωτερικής επιφάνειας του τοιχώματος του βακτηρίου περιέχει φωσφορυλοχολίνη, συνδέεται ομοιοπολικά με την πεπτιδογλυκάνη και συνθέτει το C-πολυσακχαρίτη, εντός της κάψας του κυττάρου, ο οποίος βρίσκεται σε όλα τα στελέχη του πνευμονιοκόκκου (Bui και συν., 2012). Ο C-πολυσακχαρίτης κατά τη φλεγμονή, αντιδρά στο αίμα με τις πρωτεΐνες οξείας φάσης, συμπεριλαμβανομένης της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (Massidda και συν., 2013).



Εικόνα 3. Δομή πνευμονιοκόκκου. Σχηματική παράσταση της κυτταρικής μεμβράνης, του κυτταρικού τοιχώματος και της κάψας του *Streptococcus pneumoniae*. Σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος, M=*N*-ακετυλομουραμικό οξύ και G=*N*-ακετυλο-D γλυκοζαμίνη. Ο (C-) πολυσακχαρίτης του κυτταρικού τοιχώματος αποτελείται από τειχοϊκό οξύ με πεπτιδογλυκάνη και φωσφορυλοχολίνη (Janoff και Musher, 2015).

Εντός του κυτταροπλάσματος, της κυτταρικής μεμβράνης και του κυτταρικού τοιχώματος του πνευμονιοκόκκου, υπάρχουν πολλές πρωτεΐνες που επιτρέπουν στο μικρόβιο να

διαφεύγει της άμυνας του οργανισμού και να επιβιώνει όταν εισέλθει στην κυκλοφορία του ανθρώπου προκαλώντας νόσο. Οι πρωτεΐνες αυτές παίζουν σημαντικό ρόλο στη μολυσματικότητα του μικροβίου και στην παθογένεια των πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων (Εικόνα 4).



Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση κυτταρικής επιφάνειας πνευμονιοκόκκου και ο ρόλος των κυρίων λοιμογόνων παραγόντων (Goldblatt και O'Brien, 2015).

Η πνευμονιολυσίνη είναι κυτταροτοξίνη, η οποία εκκρίνεται από τον πνευμονιόκοκκο και προκαλεί κυτταρόλυση των κυττάρων και των ιστών και ενισχύει την παθογένεια του *lytA*, ενώ άλλες πρωτεΐνες του κυτταρικού τοιχώματος παρεμβαίνουν στις οδούς του συμπληρώματος και παρεμποδίζουν έτσι την λύση των μικροβιακών κυττάρων ή/και την οψωνοφαγοκυττάρωση. Ιδιαίτερη σπουδαιότητα στην παθογένεια της πνευμονιοκοκκικής νόσου αποτελούν οι πρωτεΐνες που δεσμεύονται με τη χολίνη, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών επιφανείας του πνευμονιοκόκου A και C (PspA, PspC), της επιφανειακής συγκολλητίνης A (CbpA) και της πρωτεΐνης C. Ο αναστολέας της πνευμονιοκοκκικής H (Hic) πρωτεΐνης εμποδίζει το σχηματισμό της C3 κονβερτάσης, ενώ η C (PspC), επίσης

γνωστή ως δεσμευτική της χολίνης πρωτεΐνη Α (CbpA), δεσμεύει τον παράγοντα Η και πιστεύεται ότι επιταχύνει τη διάσπαση του C3. Οι πρωτεΐνες PspA και CbpA αναστέλλουν το κλάσμα C3b (Donkor και Badoe, 2014, Goldblatt και O'Brien, 2015).

Πλήθος πρωτεϊνών του πνευμονιοκόκκου πιστεύεται ότι εμπλέκεται στην προσκόλληση, όπως η νευραμινιδάση, NanA, η οποία διασπά το σιαλικό οξύ στα κύτταρα και στις πρωτεΐνες του ξενιστή και η επιφανειακή πνευμονιοκοκκική προσκολλητίνη Α (PsaA). Τα ινίδια (Pili) αναγνωρίστηκαν πρόσφατα με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, ότι επίσης μπορεί να παίζουν ρόλο στην προσκόλληση (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Κύριοι λοιμογόνοι παράγοντες πνευμονιοκόκκου και μηχανισμός δράσης

Λοιμογόνος παράγων	**Μηχανισμός δράσης**
Πολυσακχαρίτης της κάψας	Αποτρέπει τη φαγοκυττάρωση και ενεργοποιεί το συμπλήρωμα
Πολυσακχαρίτης του κυτταρικού τοιχώματος	Προκαλεί τη φλεγμονή με ενεργοποίηση του συμπληρώματος και διεγείρει την απελευθέρωση κυτταροκινών
Πνευμονιολυσίνη	Κυτταροτοξική δράση, ενεργοποιεί το συμπλήρωμα και τις κυτταροκίνες
PspA (Πνευμονιοκοκκική πρωτεΐνη Α) επιφανείας)	Αναστέλλει την φαγοκυττάρωση εμποδίζοντας την ενεργοποίηση και την απόθεση του συμπληρώματος στην επιφάνεια του βακτηρίου
PspC (Πνευμονιοκοκκική πρωτεΐνη C επιφανείας)	Αναστέλλει την φαγοκυττάρωση με δέσμευση του παράγοντα Η του συμπληρώματος
PsaA (Πνευμονιοκοκκικό επιφανειακό αντιγόνο Α)	Εμποδίζει την προσκόλληση
Αυτολυσίνη	Ελευθερώνει συστατικά και προκαλεί λύση των μικροβίων
Νευραμινιδάση	Πιθανότατα συμβάλλει στην προσκόλληση
Υαλουρονιδάση	Συμβάλλει στη διείσδυση και βοηθά στην εξάπλωση της μόλυνσης μέσω των ιστών του ξενιστή
Pili (Ινίδια στην επιφάνεια του κυττάρου)	Αναστέλλουν την φαγοκυττάρωση και ευνοούν την εισβολή

2.3 Ορότυποι πνευμονιοκόκκου

2.3.1 Σύνθεση ελύτρου, ονοματολογία οροτύπων

Όλα σχεδόν τα στελέχη του πνευμονιοκόκκου περιβάλλονται από έλυτρο (κάψα) πολυσακχαριδικής χημικής σύνθεσης. Μικρό ποσοστό στελεχών έχει περιγραφεί να στερείται ελύτρου. Τα στελέχη αυτά συνήθως προκαλούν επιπεφυκίτιδα ή αποικίζουν τον ρινοφάρυγγα, κυρίως μετά τη χρήση των συζευγμένων εμβολίων (Carvalho και συν., 2003, Geno και συν., 2015, Marsh και συν., 2010). Η κάψα συντίθεται εντός του κυτταροπλάσματος, αποτελείται από επαναλαμβανόμενους ολιγοσακχαρίτες, πολυμερίζεται και μεταφέρεται στην επιφάνεια του μικροβίου με την τρανσφεράση της κυτταρικής μεμβράνης. Οι πολυσακχαρίτες αυτοί δεσμεύονται ομοιοπολικά με την πεπτιδογλυκάνη του κυτταρικού τοιχώματος και τον C-πολυσακχαρίτη, γεγονός που εξηγεί τη δυσκολία του διαχωρισμού του καψικού πολυσακχαρίτη από το κυτταρικό τοίχωμα κατά την παρασκευή του εμβολίου (Geno και συν., 2015).

Οι πνευμονιόκοκκοι διακρίνονται σε τύπους ή οροτύπους και οροομάδες βάσει της αντιγονικής σύνθεσης του καψικού πολυσακχαρίτη, ο οποίος τυποποιείται με ειδικούς αντιορούς που έχουν παρασκευασθεί με την ανοσοποίηση κονίκλων με στελέχη πνευμονιοκόκκου που διεγείρουν την παραγωγή ειδικών αντισωμάτων. Όταν το μικρόβιο έλθει σε επαφή με ομόλογο αντιορό παρατηρείται συγκόλληση και εξοίδηση της κάψας, αντίδραση Quellung ή δοκιμασία Neufeld (Beckler και Macleod, 1934, Sorensen 1993, Slotved και συν., 2004). Η μέθοδος περιγράφηκε από τον Neufeld το 1902 και αργότερα υιοθετήθηκε ευρέως ως η πλέον κατάλληλη μέθοδος για την οροτυπία του πνευμονιοκόκκου (Beckler και Macleod, 1934, Cooper και συν., 1932, Lund 1960). Επειδή τα αντισώματα ειδικών ορών (κονίκλων) είναι η βάση για τον προσδιορισμό των διαφόρων τύπων του πνευμονιόκοκκου ονομάζονται ορότυποι.

Αναγνωρίζονται σήμερα τουλάχιστον 93 ορότυποι, 25 τύποι που περιλαμβάνουν ένα ορότυπο και 21 οροομάδες η καθεμία από αυτές περιέχει δύο με έξι οροτύπους οι πολυσακχαρίτες των οποίων σχετίζονται αντιγονικά. Στις 21 οροομάδες περιλαμβάνονται 68 ορότυποι μετά την πρόσφατη ανακάλυψη των οροτύπων 6C, 6D και 11E (Calix και Nahm, 2010, Henrichsen 1995, Oftadeh και συν., 2010, Park και συν., 2007).

Η ονοματολογία που έχει επικρατήσει δόθηκε από το “Statens Serum Institute” της Κοπεγχάγης της Δανίας. Οι τύποι και οι οροομάδες ονομάζονται με αριθμούς, ενώ οι ορότυποι μέσα στις οροομάδες με τον αριθμό της οροομάδας και ένα κεφαλαίο γράμμα της

αγγλικής αλφαβήτου. Για παράδειγμα η οροομάδα 19 περιλαμβάνει τους οροτύπους 19F, 19A, 19B, και 19C. Το γράμμα F (First) δείχνει το πρώτο μέλος της ομάδας που αναγνωρίστηκε και ακολουθείται από A, B, C, D, E, κ.λ.π (Πίνακας 2). Εξαίρεση αποτελούν οι οροομάδες 6 και 9 που δεν έχουν ορότυπο F. Όσον αφορά την οροομάδα 9 περιλαμβάνει 4 οροτύπους (9A, 9L, 9N, 9V), στους τρείς από τους οποίους η ονοματολογία έγινε από τα αρχικά γράμματα ως εξής: 9L (από την Εταιρεία Lederle Laboratories, Inc.), 9N (από το New York State Laboratory) και 9V (από τον Δανό Πρίγκιπα "Valdemar"). Σημειωτέον ότι αντιοροί από οροτύπους 9L και 9N που είχαν παρασκευαστεί από τα παραπάνω εργαστήρια, χορηγήθηκαν στον Πρίγκιπα Valdemar που έπασχε από σοβαρή πνευμονιοκοκκική πνευμονία, χωρίς θεραπευτική ανταπόκριση με αποτέλεσμα ο Πρίγκιπας να καταλήξει το 1939. Αυτό έγινε αφορμή για περαιτέρω έρευνα νέων οροτύπων και το νέο στέλεχος που απομονώθηκε από αυτόν ονομάστηκε 9V, από το αρχικό γράμμα του όνοματός του (Geno και συν., 2015, Henrichsen 1995, Henrichsen 1999, Slotved και συν., 2004, Kuch και συν., 2010, Parra και συν., 2014).

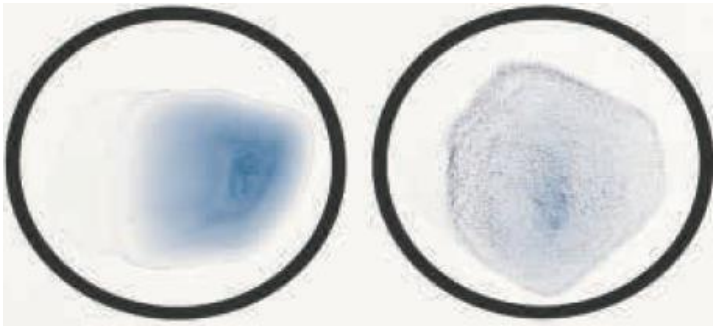
Πίνακας 2. Ονοματολογία 93 οροτύπων *S. pneumoniae**

Ορότυποι (n=25)	Οροομάδες (n=21)
1	6A, 6B, 6C, 6D
2	7A, 7B, 7C, 7F
3	9A, 9L, 9N, 9V
4	10A, 10B, 10C, 10F
5	11A, 11B, 11C, 11D, 11E, 11F
8	12A, 12B, 12F
13	15A, 15B, 15C, 15F
14	16A, 16F
20	17A, 17F
21	18A, 18B, 18C, 18F
27	19A, 19B, 19C, 19F
29	22A, 22F
31	23A, 23B, 23F
34	24A, 24B, 24F
36	25A, 25F
37	28A, 28F
38	32A, 32F
39	33A, 33B, 33C, 33D, 33F
40	35A, 35B, 35C, 35F
42	41A, 41F
43	47A, 47F
44	
45	
46	
48	

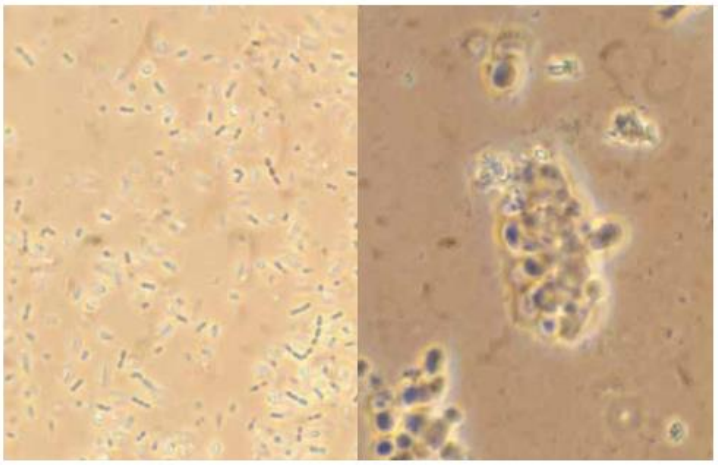
** Έχουν περιγραφεί 25 ορότυποι και 21 οροομάδες που περιλαμβάνουν 68 επιπλέον οροτύπους.*

2.3.2 Μέθοδοι προσδιορισμού οροτύπων

Η ορολογική μέθοδος χρησιμοποιείται ευρέως για την τυποποίηση των στελεχών σε οροτύπους (Henrichsen 1995, Henrichsen 1999, Slotved και συν., 2004). Χρησιμοποιούνται ειδικοί αντιοροί από το Statens Serum Institut (Copenhagen, Denmark) που έχουν παρασκευασθεί μετά από ανοσοποίηση κονίκλων με κάθε οροτύπου καψικό πολυσακχαρίτη, ο οποίος διεγείρει την παραγωγή αντισωμάτων. Με τη μέθοδο συγκολλήσεως Latex (Pneumotest-Latex) γίνεται ο προσδιορισμός του τύπου/οροτύπου ή της οροομάδας (Εικονα 5), ενώ με μέθοδο εξοίδησης του ελύτρου (Neufeld ή Quellung reaction), σε μικροσκόπιο αντιθέτου φάσεως προσδιορίζεται ο ορότυπος κάθε οροομάδας (Εικόνα 6). Επίσης ο προσδιορισμός του οροτύπου μπορεί να γίνει με μοριακές μεθόδους, όπως η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) ή PCR αληθινού χρόνου (Real Time PCR).



Εικονα 5. Δοκιμασία συγκόλλησης Latex - Στα αριστερά αρνητική συγκόλληση και δεξιά θετική (Skovsted, Statens Serum Institut Textbook, 2015).



Εικόνα 6. Δοκιμασία Neufeld ή Quellung, αριστερά αρνητική και δεξιά θετική αντίδραση (Skovsted, Statens Serum Institut Textbook, 2015).

2.3.3 Ορότυποι που προκαλούν νόσο και γεωγραφική κατανομή

Όλοι οι ορότυποι του πνευμονιοκόκκου δεν είναι εξίσου παθογόνοι. Μόνο μικρός σχετικά αριθμός από τους 93 γνωστούς οροτύπους συνήθως προκαλεί σοβαρή νόσο, ιδιαίτερα μεταξύ των μη εμβολιασμένων ατόμων. Το φάσμα των οροτύπων που προκαλούν νόσο διαφέρει στις διάφορες ηλικιακές ομάδες (Madhi και Pelton, 2008). Για παράδειγμα, δεδομένα από στις ΗΠΑ για την περίοδο 2006-2007 δείχνουν ότι οι 23 ορότυποι που περιλαμβάνονται στο 23-δύναμο πολυσακχαριδικό εμβόλιο (PPSV23) κάλυπταν το 84% των περιπτώσεων που απομονώνονταν από παιδιά <5 ετών, το 76% από άτομα ηλικίας 18-64 ετών και μόνο το 65% από άτομα ≥65 ετών (Kyaw και συν., 2005).

Η κατανομή τους ποικίλλει ανάλογα με τη νόσο που προκαλούν, την ηλικία του ατόμου και τη γεωγραφική περιοχή. Περισσότερα δεδομένα σχετικά με τη κατανομή των οροτύπων αφορούν σε παιδιά με διεισδυτική πνευμονιοκοκκική νόσο (ΔΠΝ) και πολύ λιγότερα σε ενήλικες. Μεταξύ των παιδιών <5 ετών, 7 ορότυποι (1, 5, 6A, 6B, 14, 19F και 23F) προκαλούν >60% των περιπτώσεων διεισδυτικής πνευμονιοκοκκικής νόσου, στα περισσότερα μέρη του κόσμου. Οι επτά αυτοί ορότυποι δεν έχουν την ίδια κατάταξη, όσον αφορά τη συχνότητα με την οποία προκαλούν νόσο σε κάθε περιοχή. Μερικοί ορότυποι π.χ., όπως ο 1 και 5 δεν προκαλούν νόσο σε περιοχές με υψηλή επίπτωση πνευμονιοκοκκικής νόσου, αλλά πολλές φορές ευθύνονται για κύματα νόσου σε περιοχές με χαμηλή επίπτωση (π.χ. Ευρώπη) ή εξάρσεις (π.χ. σε στρατώνες) ή μηνιγγίτιδα στην υποσαχάρια Αφρική. Ο λόγος για την επικράτηση ορισμένων οροτύπων έναντι άλλων σε ΔΠΝ είναι ασαφής.

Σε μία ανασκόπηση 70 μελετών διαπιστώθηκε ότι οκτώ οροομάδες εκ των οποίων οι ακόλουθες τρεις 6, 19, και 23 ήταν οι συχνότερες, μαζί με τους οροτύπους 1 και 14 αντιπροσώπευαν το μεγαλύτερο ποσοστό διεισδυτικής νόσου σε μικρά παιδιά, πριν από την ευρεία εφαρμογή του επταδυνάμου συζευγμένου εμβολίου (PCV7) κατά του πνευμονιοκόκκου, σε κάθε γεωγραφική περιοχή ή ήπειρο. Οι ίδιες οροομάδες και ορότυποι, μαζί με τον ορότυπο 3, κυριαρχούσαν επίσης σε μεγαλύτερα παιδιά και ενήλικες (Hausdorff, 2000b). Σημαντική διακύμανση των οροτύπων που προκαλούν ΔΠΝ στα παιδιά και καλύπτονται από το PCV7 παρατηρείται στις διάφορες χώρες (Hausdorff και συν., 2001, Hausdorff, 2002a, Paraskakis και συν., 2006, Zissis και συν., 2004). Σε μικρά παιδιά, η υψηλότερη κάλυψη των οροομάδων που περιλαμβάνονται στο PCV7 (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, και 23F) έχει αναφερθεί στις ΗΠΑ, στον Καναδά και στην Αυστραλία 80-90%, ακολουθεί η Ευρώπη με την Αφρική 70-75%, η Λατινική Αμερική ~65% και τέλος η Ασία 30-50% (Hausdorff και συν., 2000a, 2005).

Μετά την εισαγωγή του PCV7 στις ΗΠΑ και πολλές άλλες χώρες, οι ορότυποι 7F και 19A κυριάρχησαν όσον αφορά στις πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις των παιδιών και σημείωσαν σε μικρότερο βαθμό άνοδο μεταξύ των λοιμώξεων των ενηλίκων, ενώ ο ορότυπος 3 δεν σημείωσε ιδιαίτερες μεταβολές, όσον αφορά στη συχνότητα και παρέμεινε πιο διαδεδομένος μεταξύ των ηλικιωμένων (Pilishvilli και συν., 2010). Μετά τη εφαρμογή των νεώτερων PCVs (10-δυνάμου και 13-δυνάμου) ορότυποι όπως 10A, 11A, 15B, 15C, 23B, 22F, 24F, 35F και πολλοί άλλοι αναδύθηκαν ως παθογόνοι σε παιδιά και ενήλικες (Hsu και συν., 2010, Isaacman και συν., 2010, Leal και συν., 2012, Weil-Olivier και συν., 2012, Varon και συν., 2015). Επίσης μεταξύ των ενηλίκων σε μία πρόσφατη μετα-ανάλυση αξιολογήθηκαν σοβαρές κλινικές εκβάσεις, που έδειξαν ότι οι ακόλουθοι ορότυποι 1, 3, 5, 7F, 8, 19A συνδέθηκαν με αυξημένο κίνδυνο για εμπύημα, ο ορότυπος 3 με νεκρωτική πνευμονία, οι ορότυποι 3 και 19A με σηπτικό σοκ, οι ορότυποι 10A, 15B, 19F, 23F με επανειλημμένα επεισόδια μηνιγγίτιδας και οι ορότυποι 3, 6B, 9N, 11A, 16F, 19F και 19A συσχετίστηκαν με αυξημένη θνητότητα. Οι λόγοι γιατί ορισμένοι ορότυποι συσχετίζονται με σοβαρότερη νόσο ή θνητότητα είναι προς το παρόν άγνωστοι (Grabenstein και Musey, 2014).

2.4 Μέθοδοι τυποποίησης και προσδιορισμού του γονότυπου *S. pneumoniae*

Η συνεχής μελέτη της επιδημιολογίας των οροτύπων και γονοτύπων των στελεχών που προκαλούν πνευμονιοκοκκική νόσο και αποικισμό είναι σημαντική σε κάθε περιοχή, γιατί επηρεάζονται από επιλεκτικούς παράγοντες του περιβάλλοντος, όπως η χρήση των αντιμικροβιακών φαρμάκων και των συζευγμένων εμβολίων.

Ο χαρακτηρισμός των παθογόνων μικροβίων πέρα από το επίπεδο του είδους είναι απαραίτητος για τη μελέτη της εξάπλωσης των διαφόρων κλώνων του μικροβίου, κατά την διάρκεια επιδημιών και στην ταυτοποίηση των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά στελεχών. Η μοριακή τυποποίηση των στελεχών του πνευμονιοκόκκου είναι σημαντική, γιατί αν και η κάψα που περιβάλλει το κυτταρικό τοίχωμα αποτελεί τη βάση για την κατηγοριοποίηση των στελεχών σε οροτύπους, η λοιμογόνος συμπεριφορά ενός οροτύπου μπορεί επίσης να σχετίζεται με τη γενετική προέλευση του στελέχους. Οι μοριακές μέθοδοι τυποποίησης των στελεχών είναι χρήσιμες για τη μελέτη εξάπλωσης ενός στελέχους εντός του νοσοκομείου ή σε μία κοινότητα, καθώς και για επιδημιολογική παρακολούθηση σε παγκόσμια εξάπλωση των παθογόνων στελεχών. (Bingen και συν., 1994, Hall, 1998, Enright και Spratt, 1999).

Για να προσδιοριστεί η γενετική συγγένεια των στελεχών χρησιμοποιήθηκαν διάφορες τεχνικές, όπως η ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο πεδίο (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE) (Bingen και συν., 1994, Lefevre και συν., 1993), η ηλεκτροφόρηση πολλών θέσεων ενζύμου (multilocus enzyme electrophoresis, MEE) (Selander και συν., 1986, Takala και συν., 1996), ο πολυμορφισμός μήκους περιοριστικών κλασμάτων (restriction fragment length polymorphism, RFLP) (Bingen και συν., 1994, Doit και συν., 2002) και πολυτοπικός προσδιορισμός αλληλουχίας (multilocus sequence typing, MLST) (Enright και Spratt, 1998, Enright και Spratt, 1999). Παρόλο που η κάθε μία δίνει χρήσιμες πληροφορίες, σήμερα χρησιμοποιείται η MLST για να καθοριστεί ένας κλώνος.

2.4.1 Πολυτοπικός προσδιορισμός αλληλουχίας (*Multilocus Sequence Typing, MLST)*

Η μέθοδος MLST η οποία προσφέρει νέα προσέγγιση για τον χαρακτηρισμό των πνευμονιοκόκκων, όπως και άλλων μικροβίων, περιγράφεται στην ιστοσελίδα http://www.mlst.net και αποτελεί αξιόπιστη διαδικασία. Χρησιμοποιεί τις αλληλουχίες εσωτερικών τμημάτων για πολλαπλασιασμό του DNA με PCR σε 7 διατηρημένα γονίδια, *aroE* (shikimate dehydrogenase), *gdh* (glucose-6-phosphate dehydrogenase), *gki* (glucose kinase), *recP* (transketolase), *spi* (signal peptidase I), *xpt* (xanthine phosphoribosyltransferase) και *ddl* (D-alanine-D-alanineligase), του πνευμονιοκόκκου και πραγματοποιείται πολυτοπικός προσδιορισμός αλληλουχίας με γενετικό αναλυτή. Λογισμικό (e-BURST) για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας (*sequence typing*, ST) και του κλώνου (clonal complex, CC) κάθε στελέχους, καθώς και της φυλογενετικής τους σχέσης με καταχωρημένα παγκόσμια στελέχη, είναι διαθέσιμο στην ιστοσελίδα spneumoniae.mlst.net (Enright και Spratt, 1998, Enright και Spratt, 1999).

3. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Ο πνευμονιόκοκκος μεταδίδεται από άτομο σε άτομο μέσω σταγονιδίων από το αναπνευστικό ως αποτέλεσμα της στενής επαφής, αποικίζει συχνά το ρινοφάρυγγα φυσιολογικών ατόμων, αλλά προκαλεί νόσο σπάνια. Ο αποικισμός με πνευμονιόκοκκο αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την εκδήλωση πνευμονιοκοκκικής νόσου. Το ποσοστό του αποικισμού είναι υψηλό στα παιδιά ηλικίας <5 ετών, 20-60% (Gray και συν., 1980, Goldblatt και O’Brien, 2015, Janoff και Musher, 2015) και ελαττώνεται στη συνέχεια σε

5-15% στον ενήλικο πληθυσμό (Goldblatt και O'Brien, 2015). Ο αποικισμός ποικίλλει και σχετίζεται με τη γεωγραφική περιοχή, την κοινωνιοοικονομική κατάσταση, το κλίμα, το βαθμό συνωστισμού και ειδικότερα την στενή επαφή με παιδιά, όπως συμβαίνει στους βρεφονηπιακούς σταθμούς που παρατηρούνται υψηλότερα ποσοστά αποικισμού μέχρι και 60%. Για λόγους που δεν έχουν διασαφηνιστεί, το ποσοστό του αποικισμού με πνευμονιόκοκκο είναι μεγαλύτερο το χειμώνα, αν και παρατηρείται σε παιδιά και ενήλικες όλο το χρόνο (Goldblatt και O'Brien, 2015, Janoff και Musher, 2015, Weinberger και συν., 2014). Ίσως αυτό να οφείλεται στην αυξημένη επίπτωση των ιογενών λοιμώξεων που προδιαθέτουν σε αποικισμό και λοίμωξη, καθώς και στην αυξημένη μετάδοση του μικροβίου λόγω συγχρωτισμού κατά τους χειμερινούς μήνες (Dagan και συν., 1996, Gray και συν., 1982, Pelton και Jacobs, 2014).

Το φάσμα των πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων κυμαίνεται από ασυμπτωματικό αποικισμό, τοπικες έως και σοβαρές διεισδυτικές ή συστηματικές λοιμώξεις (CDC, 2010a, Madhi και Pelton, 2008, Pelton και Jacobs, 2014). Όταν το μικρόβιο διέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος, υπό ορισμένες συνθήκες μετά από αποικισμό του φάρυγγα, προκαλεί βακτηριαιμία και στην συνέχεια μπορεί να εντοπισθεί σε οποιοδήποτε όργανο και να προκαλέσει νόσο όπως πνευμονία με μικροβιαιμία, μηνιγγίτιδα, οστεομυελίτιδα, περιτονίτιδα ή ενδοκαρδίτιδα. Επίσης μπορεί να προκαλέσει τοπικές λοιμώξεις, δηλαδή μέση πυώδη ωτίτιδα (ΜΠΩ), ιγμορίτιδα και πνευμονία χωρίς μικροβιαιμία (Σχήμα 6) (Zangwill και συν., 1996).

Η συχνότητα της πνευμονιοκοκκικής νόσου ποικίλλει ανάλογα με την εποχή (υψηλότερη το χειμώνα), το φύλο (μικρή υπεροχή στους άρρενες) και την ηλικία (συχνότερα νοσούν τα παιδιά ≤5 ετών, κυρίως ≤2 ετών και οι ενήλικες ≥64 ετών). (CDC, 2010a, Tan, 2012, Syriopoulou και συν., 2012, Zangwill και συν., 1996). Η επίπτωση και η σοβαρότητα των πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων είναι ιδιαίτερα σημαντικές σε άτομα με υποκείμενη παθολογική κατάσταση, όπως ανατομική ή λειτουργική ασπληνία (δρεπανοκυτταρική αναιμία, υπερσπληνισμό, σπληνεκτομή), συγγενής ανοσοανεπάρκεια (κυρίως έλλειψη της IgG2), επίκτητη ανοσοκαταστολή εξαιτίας νοσήματος ή θεραπείας, χρόνια νοσήματα αναπνευστικού κυκλοφορικού και ήπατος, νεφρωσικό σύνδρομο ή χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, σακχαρώδης διαβήτης ή άλλο χρόνιο μεταβολικό νόσημα, διαφυγή εγκεφαλονωτιαίου υγρού από συγγενείς ή επίκτητες αιτίες, κοχλιακά εμφυτεύματα και HIV λοίμωξη (Burman και συν., 1985, Kyaw 2005, Madhi και συν., 2008, Tan, 2012).

Η επίπτωση της ΔΠΝ πριν από τη χρήση του PCV7 στα παιδιά μικρότερα των 2 ετών ποίκιλλε, από λιγότερο από 100 περιπτώσεις/100.000 στη Φινλανδία μέχρι πάνω από 1.000 περιπτώσεις/100.000 στους ιθαγενείς (Aboriginal) της Αυστραλίας (Greenwood, 1999). Εν μέρει, η μεταβλητότητα αυτή αντικατοπτρίζει τον αυξημένο κίνδυνο για παιδιά με καταστάσεις όπως η δρεπανοκυτταρική αναιμία ή HIV λοίμωξη, αλλά γενικά η νόσος ήταν συχνή και σε υγιή παιδιά. Οι μεγάλες γεωγραφικές διαφορές στη συχνότητα των ΔΠΝ δεν μπορούν να ερμηνευθούν. Η επίπτωση των ΔΠΝ συσχετίζεται επίσης με τον τρόπο του ζουν τα παιδιά στις περισσότερες βιομηχανικές χώρες, τα οποία έχουν μικρότερη νοσηρότητα από αυτά που ζουν σε λιγότερο βιομηχανοποιημένες χώρες. Η συχνότητα των ΔΠΝ σε παιδιά μικρότερα των 5 έως 6 ετών στη Δυτική Ευρώπη (π.χ., Φιλανδία, Ηνωμένο Βασίλειο, Γερμανία, Ελβετία, Δανία και Ισπανία) ήταν χαμηλότερη από 25 περιπτώσεις/100.000 πληθυσμού ανά έτος, από διάφορες μελέτες. Στη Χιλή, την Αυστραλία και τη Νέα Ζηλανδία, ήταν 25 έως 60 περιπτώσεις/100.000, ενώ κατά την ίδια περίοδο στις ΗΠΑ η επίπτωση ήταν 65 έως 75 περιπτώσεις/100,000 (Hausdorff και συν., 2001).

Σημαντικές αλλαγές στην επιδημιολογία της διεισδυτικής πνευμονιοκοκκικής νόσου παρατηρήθηκαν στις ανεπτυγμένες χώρες, μετά τη χρήση των PCVs για το συστηματικό εμβολιασμό των παιδιών, όσον αφορά στην επίπτωση και βαρύτητα της νόσου, την κατανομή των οροτύπων που ευθύνονται γι' αυτή και την αντοχή στα αντιβιοτικά **(**Greenwood 1999, Hausdorff και συν 2002b, Madhi και συν., 2008, Tan 2012, Whitney και συν., 2003). Η εφαρμογή των PCVs είχε σημαντική επίδραση στην ελάττωση της ΔΠΝ σε όλες τις χώρες που χρησιμοποιήθηκαν, εντούτοις οι μεταβολές που παρατηρήθηκαν στην επίπτωση της νόσου ποίκιλλαν μεταξύ των διαφόρων πληθυσμών, ανάλογα με τα ποσοστά κατανομής των οροτύπων του εμβολίου και την εμβολιαστική κάλυψη του πληθυσμού σε κάθε περιοχή (Barricarte και συν., 2007, Black και συν., 2007, Deceuninck, και συν., 2010, Domınguez και συν., 2011, Kellner και συν., 2009, Lehmann και συν., 2010, Pilishvili, και συν., 2010, Ruckinger και συν., 2010, Whitney και συν., 2003).

Τα PCVs μετά την εφαρμογή τους προκάλεσαν ανάδυση νέων οροτύπων στον αποικισμό και στις πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις. Παρατηρήθηκε αυξημένη εμφάνιση οροτύπων, που δεν περιλαμβάνονται στο PCV7 όπως 1, 7F, 19A (Feikin και συν., 2013, Hausdorff και συν., 2012, Hicks και συν., 2007, Koutouzis και συν., 2009, Maraki και συν., 2010, Stamboulidis και συν., 2011) καθώς και ορότυποι που δεν περιλαμβάνονται στο PCV10 και στο PCV13 (Grivea και συν., 2011, Hausdorff και συν., 2012, Pilishvili και συν., 2010, Yildirim και συν., 2012). Η ανάδυση νέων οροτύπων συσχετίσθηκε με αλλαγή στις κλινικές εκδηλώσεις και στα ποσοστά εμφάνισης της νόσου, τις διάφορες ηλικιακές ομάδες, καθώς και στη συχνότητα και προφιλ της αντοχής στα αντιβιοτικά.

4. ΑΝΤΟΧΗ *S. PNEUMONIAE* ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

4.1 Εισαγωγή

Οι πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις αντιμετωπίζονταν για πολλά χρόνια με πενικιλλίνη ή αμπικιλλίνη γιατί ο πνευμονιόκοκκος ήταν ευαίσθητος σε αυτά. Η πενικιλλίνη πρωτοχρησιμοποιήθηκε για το σκοπό αυτό στη δεκαετία του 1940. Μη ευαίσθητος στην πενικιλλίνη πνευμονιόκοκκος παρατηρήθηκε για πρώτη φορά το 1967 (Hansman και Bullen, 1967). Έκτοτε, η εμφάνιση μη ευαίσθητων στην πενικιλλίνη στελεχών συνέχισε να αυξάνεται παγκοσμίως, στις πιο πρόσφατες δεκαετίες και εξελίχθηκε βαθμιαία σε σημαντικό κλινικό πρόβλημα δημόσιας υγείας στη δεκαετία του 1990. Η αυξημένη χρήση των αντιβιοτικών φαίνεται να είναι ο πρωταρχικός παράγων για την ανάπτυξη αντοχής (Bogaert και συν., 2000, Breiman και συν., 1994, Hansman και συν., 1971)

Η ανάπτυξη αντοχής του πνευμονιοκόκκου σε μία ή περισσότερες ομάδες αντιβιοτικών με επικράτηση ανθεκτικών στελεχών, με αυξημένες ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις (minimal inhibitory concentrations, (MICs), σημειώθηκε μετά το 1970 σε πολλές περιοχές, ιδίως σε στελέχη που απομονώνονται από παιδιά. Πριν από το 1970, όλα σχεδόν τα στελέχη του πνευμονιοκόκκου αναστέλλονταν in vitro, από πυκνότητα πενικιλλίνης μικρότερη ή ίση με 0,06 μg/mL (επίπεδο συνήθως εφικτό στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό με μέγιστες δόσεις πενικιλλίνης).

Στα τέλη του 1970 σημειώθηκε επιδημία από στελέχη με υψηλού επιπέδου αντοχή στην πενικιλλίνη σε ένα νοσοκομείο στο Γιοχάνεσμπουργκ της Νότιας Αφρικής, γεγονός που αποτελεί ορόσημο στην εξέλιξη της αντοχής του πνευμονιοκόκκου (Jacobs και συν., 1978). Έκτοτε, ανθεκτικός στη πενικιλλίνη πνευμονιόκοκκος και σε άλλα β-λακταμικά αντιβιοτικά, άρχισε να απομονώνεται με αυξανόμενη συχνότητα σε όλο τον κόσμο και να σημειώνονται κλινικές αποτυχίες στη θεραπεία των πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων με πενικιλλίνη, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις μηνιγγίτιδας. Τα ευαίσθητα στελέχη άρχισαν να αντικαθίστανται με στελέχη με ενδιάμεση αντοχή, MIC ίση με 0,12 έως 1 μg/mL και με ανθεκτικά στελέχη, MIC $\geq$ 2 μg/mL (Πίνακας 3). (McDougal και συν., 1995, Smith και συν., 2001, von Gottberg και συν., 2008).

Ο επιπολασμός των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά στελεχών πνευμονιοκόκκου διαφέρει σε μεγάλο βαθμό στις διάφορες γεωγραφικές περιοχές και εξαρτάται από την κατανάλωση των αντιβιοτικών και τη χρήση των συζευγμένων πνευμονιοκοκκικών εμβολίων (Dagan και συν.,

2015). Η επικράτηση των μη ευαίσθητων στην πενικιλλίνη στελεχών του *S. pneumoniae* το 2009, στην Ευρώπη κυμαινόταν σε 25-50% στην Ισπανία, τη Γαλλία, την Ελλάδα και το Ισραήλ, 10-25% στην Πορτογαλία, την Ιρλανδία, τη Φινλανδία και την Τουρκία, 5-10% στην Ιταλία και 1-5% στο Ηνωμένο Βασίλειο, τη Γερμανία, την Αυστρία, τη Νορβηγία και τη Σουηδία (Reinert, 2009).

Πνευμονόκοκκοι με χαμηλή MIC στην πενικιλλίνη παραμένουν ευαίσθητοι στις περισσότερες ομάδες αντιβιοτικών. Σε αντίθεση, στελέχη με υψηλή MIC στην πενικιλλίνη, είναι πιθανό να παρουσιάζουν αντοχή και σε άλλα αντιβιοτικά. Επί του παρόντος, στις ΗΠΑ περίπου το 35% όλων των πνευμονιοκόκκων είναι ανθεκτικοί στις μακρολίδες, 10% στην κλινδαμυκίνη, 30% στην τριμεθοπρίμη/σουλφαμεθοξαζόλη, 18% στη δοξυκυκλίνη, και 2% στις νεότερες κινολόνες (Jenkins και συν., 2009).

Τα γονίδια *erm*(B) και *mef*(A) ανευρίσκονται σε ίσες αναλογίες. Στην Ευρώπη, παρατηρείται υψηλότερο ποσοστό ανθεκτικών στις μακρολίδες στελεχών πνευμονιοκόκκου και στην πλειοψηφία των περιπτώσεων το υπεύθυνο γονίδιο είναι *erm*(B). Τα ποσοστά αντοχής είναι χαμηλότερα στον Καναδά από ότι στις ΗΠΑ και υψηλότερα στην Άπω Ανατολή από ότι στην Ευρώπη. Γενικά το 98% των στελεχών παραμένουν ευαίσθητοι στις φθοριοκινολόνες, πιθανώς επειδή τα φάρμακα αυτά δεν χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία παιδιών. Στον Καναδά, η αυξημένη αντοχή συσχετίζεται με την αύξηση κατανάλωσης των κινολονών (Adam και συν., 2009, Chen και συν., 1999). Επίσης παρατηρήθηκε αυξημένη αντοχή στις κινολόνες, ≥5% σε πνευμονολογικές κλινικές και γηροκομεία όπου η χρήση τους είναι υψηλή (Weiss και συν., 2001).

Πιο πρόσφατα, οι αλλαγές στη χρήση αντιμικροβιακών και η εισαγωγή των PCVs έχουν σημαντικά μεταβάλει το προφίλ αντοχής του *S. pneumoniae* σε ορισμένες χώρες. Στελέχη με μειωμένη ευαισθησία στην πενικιλλίνη G, κεφοταξίμη, κεφτριαξόνη, μακρολίδες και άλλα αντιβιοτικά απομονώνονται τώρα σε όλο τον κόσμο και αντιπροσωπεύουν ένα σημαντικό ποσοστό των παθογόνων στελεχών σε πολλές περιοχές, ιδίως μεταξύ των παιδιών. Αντοχή του πνευμονιοκόκκου δεν έχει ακόμη τεκμηριωθεί στα γλυκοπεπτίδια (vancomycin), τις οξαζολιδινόνες (linezolid), νεότερες κεφαλοσπορίνες (ceftaroline), κετολίδες (telithromycin και cethromycin), τις γλυκυλκυκλίνες (tigecycline) και τα λιποπεπτίδια (daptomycin).

4.2 Παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη αντοχής

Πολλοί παράγοντες έχουν περιγραφεί ότι ευθύνονται για την ανάπτυξη αντοχής του πνευμονιοκόκκου στα αντιβιοτικά. Οι περισσότερες μελέτες συσχετίζουν την ανάπτυξη αντοχής στην επιλεκτική πίεση που συνδέεται με την εκτεταμένη χρήση των αντιβιοτικών, καθώς και την κλωνική επέκταση και εξάπλωση των πολυανθεκτικών στελεχών *S. pneumoniae*. Η έκθεση σε αντιβιοτικά σχετίζεται άμεσα με την αντοχή του πνευμονιοκόκκου σε εθνικό επίπεδο (Bronzwaer και συν., 2002, Syrogiannopoulos και συν., 2002). Ακόμη και σε χώρες με παρόμοια κοινωνικοοικονομική κατάσταση, η πολιτική της χρήσης των αντιβιοτικών προκαθορίζει την αντοχή (Van Eldere και συν., 2007, Hicks και συν., 2011). Η αντοχή μπορεί να έχει σχέση με την έκθεση σε ατομικό επίπεδο στα αντιβιοτικά (Vanderkooi και συν., 2005), αλλά επίσης υπάρχουν στοιχεία που υποδηλώνουν ότι η μεγάλη διάρκεια της έκθεσης ενός ατόμου σε αντιβιοτικά αποτελεί κίνδυνο για την απόκτηση ανθεκτικών στελεχών στο συγκεκριμένο άτομο (Schrag και συν., 2001). Η παρακολούθηση παιδικού σταθμού αποτελεί έναν επιπλέον παράγοντα κινδύνου για την απόκτηση ανθεκτικών στελεχών πνευμονιοκόκκου στα παιδιά (Yagupsky και συν., 1998). Επίσης, πάσχοντες από HIV λοίμωξη έχουν αυξημένο κίνδυνο αποικισμού ή νόσησης από ανθεκτικά στελέχη, για διάφορους λόγους, κυρίως όμως γιατί τα άτομα αυτά λαμβάνουν συχνά αντιβιοτικά και χημειοπροφύλαξη (Buie και συν., 2004, Granizo και συν., 2000).

Μερικές μελέτες αναφέρουν την ηλικία του ατόμου ως παράγοντα κινδύνου, με υψηλότερο ποσοστό αντοχής να παρατηρείται στα παιδιά, ακολουθούν οι ηλικιωμένοι και τέλος οι νεαροί ενήλικες (Crowther-Gibson και συν., 2012). Στις περιπτώσεις όπου συγκεκριμένα αντιβιοτικά δεν έχουν άδεια για γενική χρήση στα παιδιά και δεν χρησιμοποιούνται συχνά, όπως οι φθοριοκινολόνες, η αντοχή σε στελέχη που απομονώνονται από παιδιά είναι σπάνια στα αντιβιοτικά αυτά και αναδύεται πρώτα σε ενήλικες (Chen και συν., 1999). Αντοχή του πνευμονιοκόκκου στις φθοριοκινολόνες σε παιδιά έχει περιγραφεί σε άτομα που υποβάλλονται σε θεραπεία για πολυανθεκτική (MDR) φυματίωση και εκτίθενται για μεγάλο διάστημα στα φάρμακα αυτά (von Gottberg και συν., 2008).

Η νοσηλεία ενός ατόμου αποτελεί κίνδυνο για την απομόνωση ανθεκτικών στελεχών πνευμονιοκόκκου, δεδομένου ότι στις περιπτώσεις αυτές χορηγούνται αντιβιοτικά, επίσης πρόσφατη νοσηλεία αποτελεί παράγοντα για απομόνωση πολυανθεκτικών στελεχών (Crowther-Gibson και συν., 2012). Τα παιδιά σε αγροτικές περιοχές έχουν γενικά μικρότερη πιθανότητα ανάπτυξης ανθεκτικών στελεχών λόγω της μικρότερης πρόσβασης σε αντιβιο-

τικά (Crowther-Gibson και συν., 2012, Mthwalo και συν., 1998). Ορισμένοι κλώνοι πνευμονιόκκου με παγκόσμια κατανομή, αποτελούν ιδιαίτερο κίνδυνο για την εμφάνιση λοιμώξεων από ανθεκτικά στελέχη στο πληθυσμό (McGee και συν., 2011). Τέλος παιδιά εμβολιασμένα με τα συζευγμένα εμβόλια έναντι του πνευμονιοκόκκου και ενήλικες που διαμένουν σε περιοχές όπου ο εμβολιασμός των παιδιών αποτελεί πρακτική ρουτίνας διατρέχουν μικρότερο κίνδυνο να νοσήσουν από πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις με ανθεκτικά στελέχη.

4.3 Προσδιορισμός ευαισθησίας στα αντιβιοτικά

Ο προσδιορισμός της ευαισθησίας του πνευμονιοκόκκου στα αντιβιοτικά είναι απαραίτητος όχι μόνο να καθοδηγήσει στην επιλογή της αντιμικροβιακής αγωγής, για ένα συγκεκριμένο ασθενή, αλλά και για τη συλλογή στοιχείων αναγκαίων για αντιμικροβιακή καθοδήγηση εμπειρικής αγωγής. Παρά την εξέλιξη των μοριακών τεχνικών και τον προσδιορισμό των μηχανισμών αντοχής των ανθεκτικών στελεχών, ο φαινοτυπικός χαρακτηρισμός της ευαισθησίας των στελεχών αποτελεί μέθοδο εκλογής στα κλινικά εργαστήρια.

Οι μέθοδοι που εφαρμόζονται σε ρουτίνα στα κλινικά εργαστήρια για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας στα αντιβιοτικά είναι η μέθοδος των δίσκων (Kirby-Bauer), και οι ποσοτικές δοκιμασίες που προσδιορίζουν την MIC σε μg/mL, που απαιτείται in vitro για να αναστείλει τον πολλαπλασιασμό του μικροβίου (μικρο ή μακρο υποδιπλάσιες αραιώσεις και Etest).

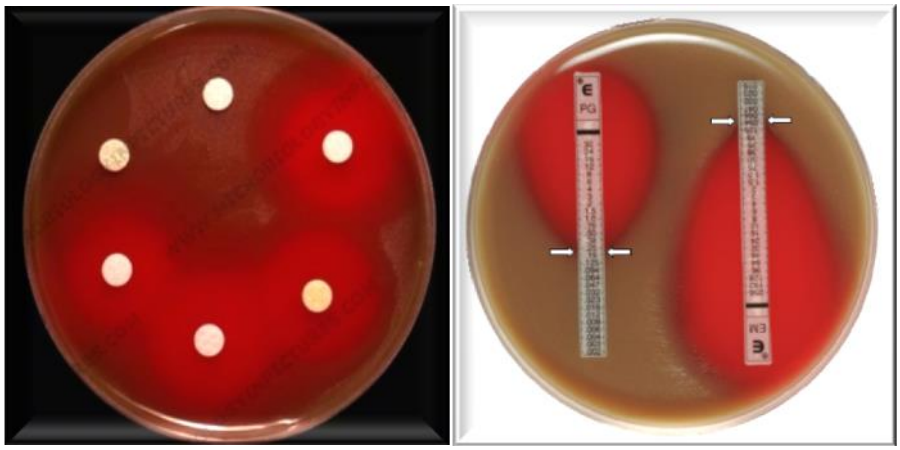
Για τη μέθοδο των δίσκων χρησιμοποιείται Mueller-Hinton άγαρ εμπλουτισμένο με 5% αίμα προβάτου, όπου μετά την επίστρωση του μικροβίου τοποθετούνται δίσκοι (6 mm) εμποτισμένοι με συγκεκριμένη ποσότητα του υπό εξέταση αντιβιοτικού, και ακολουθεί επώαση στους 35-37°C παρουσία ~5% CO2. Η ζώνη αναστολής (Εικόνα 7) χρησιμοποιείται ως μέτρο της ευαισθησίας η οποία ερμηνεύεται με ειδικούς πίνακες του Ινστιτούτου Κλινικών και Εργαστηριακών Προτύπων (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI).

Για την ευαισθησία του πνευμονιοκόκκου στην πενικιλλίνη με Kirby-Bauer χρησιμοποιείται δίσκος οξακιλλίνης 1.0 μg. Διάμετρος ζώνης αναστολής ≥20 mm χαρακτηρίζει τα στελέχη ως ευαίσθητα. Από τις ποσοτικές δοκιμασίες που προσδιορίζουν την MIC το Etest (AB Biodisk, Solna, Sweden, bioMérieux SA, Lyon, France) εφαρμόζεται συχνότερα λόγω της εύκολης εφαρμογής και μεγάλης αξιοπιστίας (Jacobs και συν., 1992). Για το Etest χρησιμοποιείται Mueller-Hinton άγαρ εμπλουτισμένο με 5% αίμα προβάτου, στο οποίο επιστρώνεται εναιώρημα μικροβίου και ακολούθως τοποθετούνται πλαστικές ταινίες

με διαβάθμιση συγκεκριμένης πυκνότητας αντιμικροβιακού από χαμηλή έως υψηλή συγκέντρωση κατά μήκος τους, η οποία απελευθερώνεται και αναστέλλει την ανάπτυξη του μικροβίου. Η MIC προσδιορίζεται στο σημείο όπου εκτείνεται η ανάπτυξη, όπως φαίνεται στην Εικόνα 7Β (Gray, 2000).

Σε κλινικό επίπεδο η εκτίμηση της αντοχής του πνευμονιοκόκκου βασίζεται σε εφαρμογή συγκεκριμένων μεθόδων και η ερμηνεία των αποτελεσμάτων τους γίνεται με θεσπισμένα κριτήρια από επιστημονικούς φορείς όπως το CLSI, την Βρετανική Εταιρεία Αντιμικροβιακής χημειοθεραπείας (British Society for Antimicrobial Chemotherapy, BSAC) και την Ευρωπαϊκή Επιτροπή για τον Έλεγχο Αντιμικροβιακής Ευαισθησίας (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST) (Edson και συν., 2006).

Τα όρια ευαισθησίας ορίζονται ως η MIC του φαρμάκου σε μg/mL που αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό ενός μικροβίου in vitro (Πίνακας 3). Για ορισμένα αντιβιοτικά, όπως η πενικιλλίνη, ο ορισμός των ανθεκτικών στελεχών αποτελεί περίπλοκο θέμα. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η MIC προσδιορίζεται με βάση μικροβιολογικά, φαρμακολογικά και κλινικά δεδομένα, που βασίζονται στην έκβαση της νόσου. Το προφίλ της αντοχής στα αντιμικροβιακά συνεχώς εξελίσσεται και γίνεται τροποποίηση των ορίων της ευαισθησίας κατά τη διάρκεια της ζωής ενός αντιβιοτικου. Ένα καλό παράδειγμα είναι η αναθεώρηση και ο επαναπροσδιορισμός από το CLSI τον Ιανουάριο του 2008 των ορίων ευαισθησίας στην πενικιλλίνη, στελεχών πνευμονιοκόκκου από μηνιγγίτιδα και από άλλες εστίες εκτός ΚΝΣ (Πίνακας 4) (CLSI 2008).



A **B**

Εικόνα 7. Έλεγχος ευαισθησίας πνευμονιοκοκκόκου (bioMérieux - culture media) : A. Kirby-Bauer (ζώνη αναστολής) σε διάφορα αντιβιοτικά και B. Etest στην πενικιλλίνη και ερυθρομυκίνη. Τα βέλη δείχνουν την τιμή ελάχιστης ανσταλτικής συγκέντρωσης (MIC).

Πίνακας 3. Προσδιορισμός Ευαισθησίας Πνευμονιοκόκκου: Όρια ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) μg/mL για τον χαρακτηρισμό των στελεχών

Αντιβιοτικό	**Ευαίσθητα**	**Ενδιάμεση αντοχή**	**Ανθεκτικά**
Penicillin	≤0,06	0,12-1	≥2
Amoxicillin	≤2	4	≥8
Cefotaxime ή Ceftriaxone	≤ 0,5	1	≥2
Erythromycin	≤0,25	0,5	≥1
Clindamycin	≤0,25	0,5	≥1
Tetracycline	≤1	2	≥4
Moxifloxacin	≤ 1	2	≥4
Trimethoprim-sulfothoxazole	≤0,5/9,5	1/19-2/38	≥4/76
Chloramphenicol	≤4	-	≥8
Rifampin	≤1	2	≥4
Vancomycin	≤1	-	-
Linezolid	≤ 2	-	-
Quinupristin-dalfopristin	≤1	2	≥4

Δεδομένα από το (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI, 2014).

Πίνακας 4. Όρια ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης, (MIC) μg/mL) στην πενικιλλίνη για κλινική χρήση

Τρόπος χορήγησης Αντιβιοτικού/Λοίμωξη	**Ευαίσθητα**	**Ενδιάμεση αντοχή**	**Ανθεκτικά**
Παρεντερική χορήγηση πενικιλλίνης, Λοιμώξεις εκτός μηνιγγίτιδας	≤ 2	4	≥ 8
Παρεντερική χορήγηση πενικιλλίνης, Μηνιγγίτιδα	≤ 0.06	-	≥ 0.12
Πενικιλλίνη V από το στόμα	≤ 0.06	≥ 0.12-1	≥2
Αμοξικιλλίνη από το στόμα	≤ 2	4	≥ 8

Δεδομένα από το (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI, 2008, 2014).

4.4 Σημασία της μικροβιακής αντοχής στην κλινική πράξη

Η κλινική σημασία της αντοχής του πνευμονιοκόκκου εξαρτάται όχι μόνο από την MIC αλλά και από τη φαρμακοδυναμική των φαρμάκων που χρησιμοποιούνται για θεραπεία. Εάν η συγκέντρωση του αντιβιοτικού στην εστία της λοίμωξης δεν υπερβαίνει την MIC, τα μικρόβια δεν θανατώνονται και η λοίμωξη δεν θεραπεύεται. Επομένως για να είναι ικανοποιητική η ανταπόκριση στη θεραπεία θα πρέπει να επιτύχουμε στάθμες φαρμάκου υψηλότερες από την MIC στην εστία της λοίμωξης και αυτό εξαρτάται από την MIC του μικροβίου, καθώς και τη δόση και φαρμακοκινητική του αντιβιοτικού που χρησιμοποιείται. Για παράδειγμα η θεραπεία της πνευμονίας σε παιδιά και ενήλικες, από στελέχη πνευμονιοκόκκου με ενδιάμεση αντοχή στην πενικιλλίνη, μπορεί να επιτευχθεί με χορήγηση υψηλών δόσεων πενικιλλίνης ενδοφλέβια σε αντίθεση με τη μηνιγγίτιδα όπου η διείσδυση του φαρμάκου δεν είναι ικανοποιητική (Friedland και Klugman, 1992a, 1992b). Στις περιπτώσεις μηνιγγίτιδας από ανθεκτικά στελέχη ή με ενδιάμεση αντοχή στην πενικιλλίνη η θεραπεία απαιτεί τη χρήση 3^{ης} γενιάς κεφαλοσπορινών μαζί με βανκομυκίνη ή φθοριοκινολόνη ή ριφαπμικίνη, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις με αντοχή και στις κεφαλοσπορίνες (Klugman και συν., 1995).

Τελευταία, η παγκόσμια αύξηση πολυανθεκτικών στελεχών πνευμονοκόκκου με αντοχή σε τρείς ή περισσότερες ομάδες αντιβιοτικών (πενικιλίνες, μακρολίδες, τετρακυκλίνες, τριμεθοπρίμη/σουλφομεθοξαζόλη) έδωσε αφορμή στην ανάπτυξη των φθοριοκινολονών. Δύο από αυτές η μοξιφλοξασίνη και η λεβοφλοξασίνη που ανήκουν στην κατηγορία των λεγόμενων «αναπνευστικών» φθοριοκινολονών χρησιμοποιούνται σήμερα στη θεραπεία της εξωνοσοκομειακής πνευμονίας και άλλων σοβαρών πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων (Hoffken και συν., 2005, Mandell και συν., 2007).

Οι κύριοι μηχανισμοί αντιμικροβιακής δράσης και αντοχής του πνευμονιοκόκκου στα αντιβιοτικά αναφέρονται στον πίνακα 5.

Πίνακας 5. Μηχανισμοί αντιμικροβιακής δράσης
και αντοχής του πνευμονιοκόκκου στα αντιβιοτικά

Αντιβιοτικό	Μηχανισμός δράσης	Μηχανισμός αντοχής
β-λακταμικά (πενικιλλίνες και κεφαλοσπορίνες)	Αναστέλλει τον σχηματισμό της πεπτιδογλυκάνης (διασταυρούμενων δεσμών) στο βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα, μέσω του τμήματος β-λακτάμης που συνδέεται με το βακτηριακό ένζυμο DD τρανσπεπτιδάσης. Αυτή η ενέργεια εξασθενεί το κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων και προκαλεί αυτόλυση.	Μετάλλαξη γονιδίων που κωδικοποιούν τις PBPs (κυρίως *pbp2x, pbp2b, pbp1a*) Μετάλλαξη γονιδίου *mur*M Μετάλλαξη άλλων γονιδίων *pdg*A, *cia*H/*cia*R, *stk*P
Μακρολίδες	Αναστέλλει την έξοδο της πεπτιδικής αλυσίδας κατά την σε σύνθεση πρωτεϊνών	*erm* γονίδιο (μεθυλίωση του 23S rRNA) *mef* γονίδια (αποβολή του φαρμάκου- μηχανισμός εκροής αντλίας, Efflux pump), *mef*(E) ή *mef*(A)
Κινολόνες	Αναστέλλει την DNA γυράση	Μεταλλάξεις στα γονίδια gyrA ή parC της DNA γυράσης
Τετρακυκλίνη	Αναστέλλει πρωτεϊνική σύνθεση (αλληλεπίδραση κωδικόνιο-αντικωδικόνιο)	Προστασία ριβοσωματικών πρωτεΐνών κυρίως tetM και σπανιότερα tetO
Χλωραμφαινικόλη	Αναστέλλει πεπτιδυλο-τρανσφεράση	Απενεργοποίηση της χλωραμφενικόλης από το ενζυμο Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT)
Τριμεθοπρίμη - Σουλφαμεθοξαζόλη	Αναστέλλει την αναγωγάση διυδροφυλλικού	Μετάλλαξη στο γονίδιο διυδροφολικής αναγωγάσης (DHFR)
Ριφαμπικίνη	Αναστέλλει τη βακτηριακή RNA πολυμεράση	Μετάλλαξη στο γονίδιο της RNA πολυμεράσης (*pro*B)
Οξαζολιδινόνες	Μετάλλαξη στο 23S rRNA	Διαγραφή του γονιδίου της L4 ριβοσωμιακής πρωτεΐνης

4.5 Μηχανισμός αντοχής στα β-λακταμικά αντιβιοτικά

Η πενικιλλίνη αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό του *S. pneumoniae* με δέσμευση ενός ή περισσοτέρων ενζύμων, όπως της τρανσπεπτιδάσης ή της καρβοξυπεπτιδάσης που είναι απαραίτητα για την σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης του κυτταρικού τοιχώματος, με αποτέλεσμα την βακτηριακή αυτόλυση. Ο κύριος μηχανισμός αντοχής του πνευμονιοκόκκου στα β-λακταμικά αντιβιοτικά είναι μέσω μεταβολών στα γονίδια που κωδικοποιούν στις πρωτεΐνες σύνδεσης της πενικιλλίνης ή PBPs (penicillin binding proteins) που είναι φυσικά συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος πολλών βακτηρίων (Grebe και Hakenbeck, 1996).

Οι PBPs συμμετέχουν σε μερικές βασικές λειτουργίες (καταλύουν τον πολυμερισμό των αλυσίδων της γλυκάνης εντός της δομή της πεπτιδογλυκάνης) του μικροβίου και είναι οι κύριοι στόχοι των β-λακταμικών αντιβιοτικών. Μεταβολές στη δομή των PBPs επέτρεψαν σε πολλά βακτήρια να αναπτύξουν αντοχή στα αντιβιοτικά. Έξι PBPs έχουν περιγραφεί στον πνευμονιόκοκκο: 1a, 1b, 2x, 2a, 2b και 3 πέντε υψηλού μοριακού βάρους και μία χαμηλού μοριακού βάρους (Zerfass και συν., 2009). Οι παραλλαγές υψηλού μοριακού βάρους είναι σε δύο κατηγορίες, την κατηγορία A (1a, 1b, 2a) και την κατηγορία B (2b και 2x) και μία PBP3 χαμηλού μοριακού βάρους. Οι μεταλλάξεις που συμβαίνουν στις PBPs μπορεί να μειώσουν τη συγγένειά τους για την πενικιλλίνη και με αυτόν τον τρόπο το μικρόβιο να γίνει ανθεκτικό (Zerfass και συν., 2009, Grebe και Hakenbeck, 1996).

Οι PBP2b και PBP2x είναι οι κύριοι καθοριστικοί παράγοντες αντοχής και κατανέμονται μεταξύ του πνευμονιοκόκκου μέσω του ιδίου είδους ή μεταξύ άλλων ειδών με ανασυνδυασμό (Coffey και συν., 1993, Coffey και συν., 1995). Ο ανασυνδυασμός φαίνεται να είναι ουσιαστικός μηχανισμός στην εξέλιξη της αντοχής στα β-λακταμικά αντιβιοτικά στη φύση, και η κλωνική εξάπλωση των ανθεκτικών στελεχών παίζει σημαντικό ρόλο στην παγκόσμια αύξηση της αντοχής στα β-λακταμικά αντιβιοτικά (McGee, 2011). Τα ανθεκτικά στελέχη παρουσιάζουν μωσαϊκό σε γονίδια που κωδικοποιούν τις 2b, 2x και 1a PBPs (Martin και συν., 1992). Η απόκτηση της αντοχής αυτής πιστεύεται ότι είναι αποτέλεσμα μεταφοράς γονιδίων μεταξύ άλλων ειδών μικροβίων (Laible G και συν., 1991, Hakenbeck και συν., 2001), ιδιαίτερα από *Streptococcus mitis* και *Streptococcus oralis* (Sibold και συν., 1994).

Μεταβολές στις υπόλοιπες PBPs έχουν σπάνια συσχετισθεί με αντοχή του πνευμονιοκόκκου. Τέλος, οι μεταλλάξεις σε άλλα γονίδια, όπως *mur*M (εμπλέκονται στη βιοσύνθεση της murein), *pdg*A (που κωδικοποιεί μία GlcNAc διακετυλάση) και *cpo*A (που

κωδικοποιεί μια γλυκοζυλοτρανσφεράση, έχουν επίσης σπάνια συσχετισθεί με αντοχή του πνευμονιοκόκκου στα β-λακταμικά αντιβιοτικά (Hakenbeck και συν., 2012, Reinert, 2009).

Η ανάπτυξη αντοχής στην πενικιλλίνη γενικά κατά κάποιο βαθμό συνδέεται και με αντοχή σε άλλα β-λακταμικά αντιβιοτικά και αντίστροφα. Μεταλλάξεις στην PBP2x παρέχουν χαμηλού βαθμού αντοχή του πνευμονιοκόκκου στην πενικιλλίνη, η οποία μπορεί να επηρεάσει και την ανάπτυξη αντοχής στις κεφαλοσπορίνες από του στόματος. Μεταβολές στην PBP2b έχουν συνήθως ως αποτέλεσμα τα στελέχη του πνευμονιοκόκκου να έχουν υψηλότερες MICs στην πενικιλλίνη (Grebe και Hakenbeck, 1996), ενώ αλλαγές στην PBP1a συνδέονται με υψηλού επιπέδου αντοχή στην πενικιλλίνη καθώς και αντοχή στις κεφαλοσπορίνες ευρέος φάσματος (Coffey και συν., 1995). Στελέχη με υψηλά επίπεδα αντοχής στην πενικιλλίνη (MIC ≥ 8 μg/mL) συνήθως εμφανίζουν μεταλλάξεις και στις τρεις PBPs (1a, 2b και 2x) και μερικές φορές και σε άλλα γονίδια, όπως *mur*M (Smith και Klugman, 2001).

Τα ποσοστά αντοχής στην αμοξικιλλίνη είναι σχετικά χαμηλά (5%), λόγω των ευνοϊκότερων φαρμακοδυναμικών ιδιοτήτων του φαρμάκου. Ειδικότερα, η PBP2b φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην έκφραση της αντοχής στην αμοξικιλλίνη (Coffey και συν., 1995). Εκτός από τις τυπικές αλλαγές στις PBP1a και PBP2x, τα στελέχη αυτά έχουν μοναδικές μεταλλάξεις στην περιοχή 590-641 του *pbp2b* γονιδίου, σε άμεση γειτνίαση με την ενεργή δεσμευτική περιοχή (Kosowska και συν., 2004, Schrag και συν., 2004).

Αντοχή στις κεφαλοσπορίνες μπορεί να αναπτυχθεί με μεταλλάξεις στα γονίδια *pbp1a* και *pbp2x*. Η στενή σύνδεση αυτών των δύο γονιδίων με το χρωμόσωμα ευνοεί τη μεταφορά και των δύο με ένα μόνο βήμα μετασχηματισμού (transformation step). Η pbp2b δεν αποτελεί στόχο για τις κεφαλοσπορίνες και παραμένει χωρίς μεταλλάξεις σε στελέχη που εκφράζουν αντοχή στις κεφαλοσπορίνες και ευαισθησία στη πενικιλλίνη (Coffey και συν., 1995). Τα περισσότερα στελέχη, τα ανθεκτικά στις ευρέος φάσματος κεφαλοσπορίνες, είναι ανθεκτικά και στην πενικιλλίνη, όπως συμβαίνει και με την αμοξικιλλίνη, οι MICs όμως στην κεφοταξίμη ή κεφτριαξόνη είναι συνήθως χαμηλότερες από τις MICs της πενικιλλίνης. Οι νεότερες κεφαλοσπορίνες, όπως ceftaroline και ceftobiprole, έχουν μεγαλύτερη συγγένεια προς τα τροποποιημένα γονίδια των PBPs, και παραμένουν δραστικές έναντι στελεχών με αντοχή στις άλλες β-λακτάμες (Davies και συν., 2012, Flamm και συν., 2014).

Στις αρχές του 1990 στις Ηνωμένες Πολιτείες, παρατηρήθηκαν στελέχη πνευμονιοκόκκου με υψηλού επιπέδου αντοχή (MIC 2-32 μg /mL) στην κεφοταξίμη και

κεφτριαξόνη, λόγω μεταλλάξεων στις PBPs 1α και 2x (Coffey και συν., 1995). Οι MICs στις κεφαλοσπορίνες των στελεχών αυτών ήταν υψηλότερες από της πενικιλλίνης, οι δε μεταλλάξεις σε ένα σημείο ($Thr_{550}Ala$) που συνδέθηκαν με τον φαινότυπο αυτό ήταν στο γονίδιο *pbp2x* (Coffey και συν., 1995). Τα στελέχη αυτά προέκυψαν από λίγους προϋπάρχοντες κλώνους και δείχνουν ότι οι μεταλλάξεις σημείου, καθώς και ανασυνδυαστικά γεγονότα είναι σημαντικά για την ανάπτυξη της αντοχής του πνευμονιοκόκκου σε αντιβιοτικά β-λακτάμης.

4.6 Αντοχή στις μακρολίδες

Οι μακρολίδες (ερυθρομυκίνη, κλαριθρομυκίνη και αζιθρομυκίνη) έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως σε όλο τον κόσμο για τη θεραπεία λοιμώξεων του αναπνευστικού συστήματος, κυρίως στα παιδιά, με αποτέλεσμα η χρήση τους να έχει οδηγήσει σε αυξημένα ποσοστά αντοχής του *S. pneumoniae* και κλινική αποτυχία σε αρκετές περιπτώσεις. Τα ποσοστά αντοχής των στελεχών του *S. pneumoniae* στις μακρολίδες ποικίλλουν σε μεγάλο βαθμό μεταξύ των χωρών, αλλά στις περισσότερες περιοχές είναι υψηλότερα από ότι η αντοχή στην πενικιλλίνη. Η αντοχή στις μακρολίδες όπως και στην πενικιλλίνη του *S. pneumoniae* διαφέρει στις διάφορες χώρες. Τα ποσοστά αντοχής στην ερυθρομυκίνη κυμαίνονται από περίπου 15% στη Λατινική Αμερική μέχρι 80% στην Άπω Ανατολή (Felmingham και συν., 2007). Μέχρι το 2009 αναφέρονταν ποσοστά αντοχής 25-50% στη Γαλλία, την Ιταλία και την Ελλάδα, 10-25% στην Ισπανία, την Πορτογαλία, το Ηνωμένο Βασίλειο, τη Γερμανία, την Πολωνία, τη Νορβηγία και τη Φινλανδία, και 1-5% στη Λετονία και τη Σουηδία (Reinert, 2009, Daikos και συν., 2008). Οι διαφορές αυτές μπορεί να οφείλονται, εν μέρει, στη συχνότητα συνταγογράφησης των αντιβιοτικών αυτών μεταξύ των διαφόρων χωρών.

Οι μακρολίδες είναι μικροβιοστατικά αντιβιοτικά που αναστέλλουν τη σύνθεση των βακτηριακών πρωτεϊνών με δέσμευση στο 23S ριβοσωμικό RNA (rRNA). Η αντοχή του πνευμονιοκόκκου στις μακρολίδες οφείλεται κυρίως σε δύο μηχανισμούς. Ο ένας μηχανισμός αντοχής οφείλεται σε τροποποίηση του στόχου (target modification) που προκαλείται από το γονίδιο *erm*(B) και ο άλλος στην αντλία εκροής του φαρμάκου (Efflux Pump), που κωδικοποιείται από γονίδια της τάξεως *mef*, στα οποία περιλαμβάνονται διάφορες παραλλαγές, όπως τα γονίδια *mef*(A) και *mef*(E) (Leclercq και Courvalin, 2002).

4.6.1 Τροποποίηση του στόχου

Ο μηχανισμός αντοχής στις μακρολίδες που προκαλείται από το γονίδιο *erm*(B), το οποίο κωδικοποιεί το ένζυμο 23S RNA μεθυλάση, έχει ως αποτέλεσμα τα στελέχη που εκφράζουν το γονίδιο αυτό να εμφανίζουν υψηλού επιπέδου αντοχή στις 14-, 15-, και 16-μελείς μακρολίδες, MIC ≥ 32 μg/mL και διασταυρούμενη αντοχή με τις λινκοσαμίδες και στρεπτογραμίνη B (MLS_B φαινότυπος). Ο μηχανισμός αυτός επικρατεί σε ορισμένες χώρες της Ασίας, της Ευρώπης, της Μέσης Ανατολής και Αφρικής.

Η έκφραση του γονιδίου *erm*(B) προκαλεί διμεθυλίωση της αδενίνης στη θέση 2058 του 23S rRNA, εμποδίζοντας τη σύνδεση της μακρολίδης στη θέση 23S. Αυτή η μεθυλίωση παρέχει, στην πλειοψηφία των πνευμονιόκοκκων, ιδιοσυστατική υψηλού επιπέδου (cMLSB φαινότυπος) ή επαγόμενη αντοχή (iMLSB) (Leclercq και Courvalin 2002). Σπάνια στον πνευμονιόκοκκο η μεθυλάση κωδικοποιείται από το γονίδιο *erm*(A), υποκατηγορία *erm*(TR) και να προσδίδει MLS_B αντοχή (Farrell και συν., 2002).

Στον πνευμονιόκοκκο τα γενετικά στοιχεία των *erm*(B) μεταφέρονται από τα τρανσποζόνια της οικογένειας *Tn*916. Έχει περιγραφεί ένας αριθμός παραγώγων του *Tn*916 που μεταφέρουν το γονίδιο *erm*(B) (*Tn*1545, *Tn*3872, *Tn*6002, και *Tn*6003), καθώς και το γονίδιο *tet*(M) επίσης μεταφέρεται από αυτά τα τρανσποζόνια (Varaldo και συν., 2009, Cochetti και συν., 2008). Επομένως, τα περισσότερα ανθεκτικά στις μακρολίδες στελέχη πνευμονιοκόκκου είναι ανθεκτικά και στις τετρακυκλίνες, αν και μερικές μελέτες έδειξαν ότι μπορεί το γονίδιο *tet*(M) στο τρανσποζόνιο *Tn*916 να είναι σιωπηλό και να μην εκφράζεται (Cochetti και συν., 2007).

Άλλες λιγότερο συχνές αλλαγές του στόχου και ανάπτυξη αντοχής είναι μεταλλάξεις στις περιοχές II και V του 23S rRNA και στα γονίδια που κωδικοποιούν τις ριβοσωμιακές πρωτεΐνες L4 και L22, οι οποίες επίσης ευθύνονται για αντοχή στελεχών πνευμονιοκόκκου στις μακρολίδες (Davies και συν., 2005, Leclercq και Courvalin, 2002, Tait-Kamradt και συν., 2000).

4.6.2 Μηχανισμός αντλίας εκροής (Efflux Pump)

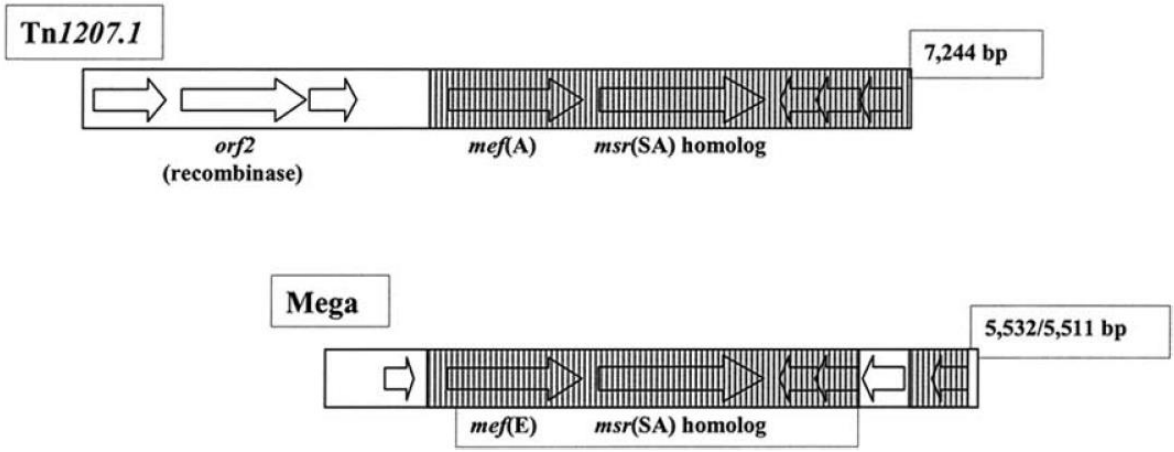
Ο μηχανισμός αυτός της ενεργού εξόδου του αντιβιοτικού από το μικροβιακό κύτταρο συνδέεται με χαμηλού επιπέδου αντοχή που επηρεάζει τα 14-μελή και 15-μελή μακρολίδια,

αλλά όχι τις λινκοσαμίδες ή στρεπτογραμίνες (Μ φαινότυπος). Τα στελέχη με φαινότυπο Μ κυριαρχούν στις ΗΠΑ, τον Καναδά και ορισμένες χώρες της Ασίας και της Ευρώπης. Ο μηχανισμός της ενεργού εκροής του αντιβιοτικού κωδικοποιείται από γονίδια της τάξεως *mef*, στα οποία περιλαμβάνονται διάφορες παραλλαγές, όπως τα γονίδια *mef*(A) και *mef*(E), τα οποία είναι 90% ταυτόσημα ως προς την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων και η σπάνια παραλλαγή *mef*(I), η οποία έχει μόνο περιγραφεί σε δύο στελέχη στην Ιταλία (Cochetti και συν., 2005). Αρχικά, τα *mef* γονίδια θεωρήθηκαν ότι είναι ειδικά για το είδος του μικροβίου και συγκεκριμένα το *mef*(A) ότι εκφράζεται μόνο στον *S. pyogenes* και το *mef*(E) στο *S. pneumoniae*, εντούτοις, το γονίδιο *mef*(A) ανιχνεύτηκε επίσης και σε ανθεκτικά στις μακρολίδες στελέχη πνευμονιοκόκκου (Del Grosso και συν., 2002, Reinert και συν., 2003).

Στο πνευμονόκοκκο, οι τρεις υποκατηγορίες των γονιδίων *mef* μεταφέρονται σε μια σειρά από παρόμοια αλλά διακριτά γενετικά στοιχεία. Το *mef* (A) βρίσκεται στο μεταθετό τρανσποζόνιο *Tn*1207.1 ή στο στενά σχετιζόμενο *Tn*1207.3, ενώ το *mef*(E) βρίσκεται στο Mega (macrolide efflux genetic assembly) στοιχείο (σχήμα 1). Το *mef*(I) γονίδιο παρουσιάζει 91,4% και 93,6% ομολογία ως προς την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων με το *mef*(A) γονίδιο στο *Tn*1207.1 τρανσοζόνιο και με το *mef* (E) στο Mega στοιχείο, αντίστοιχα (Cochetti και συν., 2005 Santagati και συν., 2000), το οποίο μεταφέρεται σε μια μη κινητή σύνθετη δομή, που ορίζεται ως 5216IQ πολύπλοκο (Mingoia και συν., 2007).

4.6.3 Διπλός φαινότυπος

Τα τελευταία χρόνια, η παρουσία τόσο του *erm*(B) όσο και των *mef* γονιδίων σε κλινικά στελέχη *S. pneumoniae* αναγνωρίζονται όλο και περισσότερο, ιδιαίτερα στις χώρες της Ασίας, αλλά και στην Ευρώπη, τη Νότια Αφρική και τις ΗΠΑ (Farrell και συν., 2005, Felmingham και συν., 2007). Η μελέτη PROTEKT, το 2003-2004, ανέφερε ότι το 12% της παγκόσμιας επίπτωσης των ανθεκτικών στις μακρολίδες στελεχών έφεραν και τα δύο γονίδια *erm*(B) και *mef*(A) (Farrell και συν., 2008). Τα γονίδια *mef*(A) και *mef*(E) φέρονται από δύο παρόμοια αλλά διαφορετικά στοιχεία, που χαρακτηρίζονται ως *Tn*1207.1 και Mega (Σχήμα1).



Σχήμα 1. Σχηματική αναπαράσταση των γενετικών στοιχείων *Tn*1207.1 και Mega που απαντούν σε κλινικά στελέχη *S. pneumoniae*. Οι ομόλογες αλληλουχίες του DNA απεικονίζονται με γκρι χρώμα (Pozzi και συν., 2004).

Η πλειοψηφία των στελεχών με διπλό φαινότυπο είναι πολυανθεκτικά και προέρχονται από κλώνους, όπως Taiwan19F-14 κυρίως κλώνοι με πολυτοπικό προσδιορισμό αλληλουχίας ST320, ST271, και ST236. Φαίνεται ότι η παγκόσμια αύξηση των στελεχών αυτών με τα δύο γονίδια *erm*(B) και *mef*(A/E) προέκυψαν μετά την εισαγωγή του συζευγμένου εμβολίου. Αυτό φαίνεται να ισχύει κυρίως για τον ορότυπο 19A, ST320 τόσο στις Ηνωμένες Πολιτείες, όσο και σε άλλες χώρες όπου η ανάδυση αυτού του κλώνου ως κύρια αιτία διεισδυτικής νόσου εμφανίστηκε πριν την εφαρμογή του PCV13.

4.7 Αντοχή στις φθοριοκινολόνες

Οι φθοριοκινολόνες ανήκουν σε σχετικά νέα κατηγορία συνθετικών αντιβιοτικών. Μελέτες επιτήρησης στις ΗΠΑ δείχνουν ότι τουλάχιστον 1% των στελεχών πνευμονιοκόκκου είναι ανθεκτικά στις λεβοφλοξασίνη, μοξιφλοξασίνη ή γεμιφλοξασίνη (Jones και συν., 2010). Στον Καναδά πρόσφατα παρατηρήθηκε αύξηση της αντοχής στις φθοριοκινολόνες σε στελέχη που προέκυψαν μετά τη χρήση του συζευγμένου εμβολίου έναντι του πνευμονιοκόκκου, όπως οι ορότυποι 19A, 35B και 11A (Patel και συν., 2011).

Στην Κροατία και το Χονγκ Κονγκ, 4-13% του συνόλου του πνευμονιόκοκκου έχουν αναφερθεί ανθεκτικά στις φθοριοκινολόνες, ενώ στην Ασία το 2009 και το 2010 σε μια μελέτη βρέθηκε ποσοστό μέχρι 4% με αντοχή στις νεότερες φθοριοκινολόνες (Wang και συν., 2011). Στις χώρες που αναφέρεται αντοχή στις φθοριοκινολόνες αυτή παρατηρείται σε στελέχη που απομονώνονται από ηλικιωμένα άτομα και σε ασθενείς με χρόνια

πνευμονοπάθεια που συχνά θεραπεύονται με φθοριοκινολόνες (Adam και συν., 2009, Ho και συν., 2001, Pletz και συν., 2006).

Ο φόβος για παγκόσμια αύξηση της αντοχής του πνευμονιοκόκκου στις φθοριοκινολόνες, όπως συνέβη με τις μακρολίδες δεν φαίνεται να υλοποιείται σύντομα, γιατί οι κινολόνες δεν χρησιμοποιούνται συχνά όπως οι μακρολίδες στα παιδιά, τα οποία αποτελούν την κύρια δεξαμενή πνευμονιοκόκκων. Αυτό υποστηρίζεται από μία πρόσφατη μελέτη από τη Νότια Αφρική, όπου παρατηρήθηκε αύξηση της αντοχής στις φθοριοκινολόνες σε στελέχη πνευμονιοκόκκου από παιδιά που έλαβαν θεραπεία με φθοριοκινολόνες για πολυανθεκτική (MDR) φυματίωση (Wolter και συν., 2009).

Ο τύπος της φθοριοκινολόνης που χρησιμοποιείται μπορεί επίσης να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην ανάπτυξη αντοχής. Σε μια μελέτη από τη Γερμανία κανένα από τα 163 στελέχη δεν ήταν ανθεκτικό στις φθοριοκινολόνες, 1,2% εμφάνισαν το πρώτο βήμα μετάλλαξης, σε σύγκριση με 16,2% των στελεχών που απομονώθηκαν από άτομα γηροκομείων στις ΗΠΑ και 6,4% από άτομα άλλων ιδρυμάτων (Pletz και συν., 2011). Η απουσία αντοχής στις φθοριοκινολόνες παρά την αυξημένη χρήση τους θα μπορούσε να εξηγηθεί λόγω της υψηλότερης κατανάλωσης νεότερων φθοριοκινολονών, τρίτης γενιάς, με αυξημένη δραστικότητα έναντι του πνευμονιόκοκκου.

Έχουν περιγραφεί διάφοροι μηχανισμοί αντοχής του πνευμονιοκόκκου στις φθοριοκινολόνες, όπως μοριακοί μηχανισμοί με μεταλλάξεις στα ένζυμα, ενεργός εκροή του αντιβιοτικού (Efflux Pump), οριζόντια μεταφορά γονιδίων και κλωνική εξάπλωση.

4.7.1 Μοριακοί μηχανισμοί αντοχής στις φθοριοκινολόνες

Οι κινολόνες μετά τη διείσδυση τους στα βακτήρια, δεσμεύονται από ένζυμα της τοποϊσομεράσης τύπου ΙΙ (π.χ γυράση του DNA και τοποϊσομεράσης IV), τα οποία είναι σημαντικά για τον αναδιπλασιασμό του DNA και την διαίρεση του κυττάρου. Και τα δύο ένζυμα είναι τετραμερή με ζεύγη δύο διαφορετικών υποομάδων: *gyr*A και *gyr*B υποομάδες της γυράσης του DNA που είναι αντίστοιχα ομόλογες με τις *par*C και *par*E υπομονάδες της τοποϊσομεράσης τύπου IV. Όταν αναπτύσσεται αντοχή στις κινολόνες η δέμευσή τους εμποδίζει την ενζυμική δραστηριότητα έτσι ώστε η βακτηριακή αντιγραφή δεν λαμβάνει χώρα. Η ειδική θέση δράσης κάθε κινολόνης καθορίζεται από το βαθμό συγγένειας της με κάθε ένζυμο. Για παράδειγμα, η σιπροφλόξασινη δεσμεύεται με την τοποϊσομεράση IV, η

λεβοφλοξασίνη έχει μεγαλύτερο βαθμό συγγένειας, από ότι η σιπροφλοξασίνη, με την τοποϊσομεράση IV και επίσης δεσμεύεται από τη γυράση του DNA, ενώ η μοξιφλοξασίνη έχει υψηλότερη δεσμευτική ικανότητα με τη γυράση του DNA από ότι με την τοποϊσομεράση IV.

4.7.2 Μεταλλάξεις στις δεσμευτικές θέσεις των ενζύμων
(Quinolone resistance-determining regions, QRDRs)

Οι μεταλλάξεις που οδηγούν σε πλήρεις διαμορφωτικές αλλαγές της δέσμευσης των κινολονών με τα ένζυμα, προσδίδουν πλήρη αντοχή στις κινολόνες. Οι μεταλλάξεις αυτές παρατηρούνται στις καθοριστικές για αντοχή στις κινολόνες περιοχές (quinolone resistance determining regions, QRDRs), ως επί το πλείστον στα ένζυμα *gyr*A και *par*C του τύπου II της τοποϊσομεράσης και σε μικρότερο βαθμό στις καθοριστικές περιοχές αντοχής των *par*E και *gyr*B. Τα στελέχη του πνευμονιοκόκκου με μία μοναδική μετάλλαξη σε ένα από τα δύο ένζυμα (“first-step mutation” ή «πρώτο βήμα μετάλλαξη») είναι ως επί το πλείστον ευαίσθητα στις φθοριοκινολόνες. Οι μεταλλάξεις που προσδίδουν αντοχή συμβαίνουν σταδιακά και παρατηρούνται στα ένζυμα *par*C ή *gyr*A, ανάλογα με την φθοριοκινολόνη που χρησιμοποιείται γίνεται και η επιλογή. Τα στελέχη συνήθως αποκτούν πλήρη ή υψηλού επιπέδου αντοχή, όταν αποκτήσουν και δεύτερη μετάλλαξη στα γονίδια στόχους (*gyr*A και / ή *par*C). Μεταλλάξεις στα γονίδια *par*E και *gyr*B μπορεί να εμφανιστούν σε ορισμένα στελέχη, αλλά δεν έχουν μεγάλη σημασία όταν είναι μεμονωμένες. Άλλες μεταλλάξεις σε άλλα ένζυμα έχουν περιγραφεί σε in vitro μελέτες (Weigel και συν., 2001, Pletz και συν., 2006).

4.7.3 Μηχανισμός αντοχής αντλίας εκροής (Efflux Pump)

Ο μηχανισμός αυτός αντοχής στις φθοριοκινολόνες δεν είναι πλήρως διασαφηνισμένος. Φαίνεται να επιτελείται από τη μεμβράνη ABC-μεταφορέα της πρωτεΐνης PmrA και άλλους αγνώστους παράγοντες. Επίσης λίγα είναι γνωστά σχετικά με το μηχανισμό ρύθμισης της έκφρασης της PmrA και την αντλία εκροής (Jumbe και συν., 2006, Pletz και συν 2011).

Μέχρι σήμερα, τα στελέχη του πνευμονιοκόκκου που εκφράζουν ως μοναδικό μηχανισμό αντοχής στις φθοριοκινολόνες την αντλία εκροής δεν εκφράζουν υψηλού επιπέδου αντοχή. Οι φθοριοκινολόνες με μικρό μέγεθος μορίου π.χ. η σιπροφλοξασίνη φαίνεται να επηρεάζονται σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι μεγαλύτερα μόρια όπως η

μοξιφλοξασίνη. Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι στελέχη με φαινοτυπική αντοχή στην σιπροφλοξασίνη επιλέγονται συχνότερα σε αυτά που εκφράζεται ο μηχανισμός αντοχής της αντλίας εκροής (Li και συν., 2002).

4.7.4 Οριζόντια μεταφορά γονιδίων και κλωνική διασπορά

Σε αντίθεση με τα β-λακταμικά αντιβιοτικά όπου ο ανασυνδυασμός και η οριζόντια μεταφορά γονιδίων φαίνεται να είναι ουσιαστικός μηχανισμός αντοχής, στις φθοριοκινολόνες ο μηχανισμός αυτός είναι αβέβαιος. Τόσο η ενδομεταφορά όσο και η μεταξύ των ειδών μεταφορά γονιδίων αντοχής στις φθοριοκινολόνες φαίνεται να είναι σπάνια. Δημοσιεύσεις αναφέρουν 0-11% αντοχή στις φθοριοκινολόνες με οριζόντια μεταφορά γονιδίων, με αναλογία που φαίνεται να είναι υψηλότερη σε στελέχη που απομονώνονται από το αναπνευστικό παρά από διεισδυτικές λοιμώξεις (Pletz και συν., 2005, Balsalobre και συν., 2003).

Αντοχή στις φθοριοκινολόνες με διασπορά ανθεκτικών κλώνων έχει αναφερθεί και έχει συσχετιστεί με την εξέλιξη της αντοχής στην πενικιλλίνη και τις μακρολίδες. Ωστόσο, ο ρόλος τους για την αύξηση της αντοχής στις φθοριοκινολόνες είναι αμφιλεγόμενος και αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η κλωνική εξάπλωση δεν παίζει σημαντικό ρόλο στην αύξηση της αντοχής των φθοριοκινολονών (Canton και συν., 2003). Δεδομένα σχετικά με την αντοχή του πνευμονιοκόκκου στη λεβοφλοξασίνη από 25 χώρες στη μελέτη PROTEKT (1999-2000), έδειξαν ότι στην πλειοψηφία των στελεχών η αντοχή δεν συσχετιζόταν γενετικά, αν και το 34% των στελεχών ανήκε στον Ισπανικό κλώνο 23F-1 (Canton και συν., 2003). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι τόσο η κλωνική διάδοση όσο και η εμφάνιση νέων ανθεκτικών στελεχών συμβάλλουν στη διάδοση της αντοχής στις φθοριοκινολόνες.

4.8 Αντοχή στις τετρακυκλίνες

Οι τετρακυκλίνες είναι ευρέως φάσματος βακτηριοστατικά αντιβιοτικά δραστικά έναντι του πνευμονιοκόκκου, τα οποία αναστέλλουν την πρωτεϊνοσύνθεση του βακτηρίου εμποδίζοντας τη σύνδεση του αμινο-ακυλ-tRNA στο ριβόσωμα. Έχουν χρησιμοποιηθεί συχνά στο παρελθόν, σε πολλές χώρες, κυρίως σε ενήλικες, για την αντιμετώπιση πολλών λοιμώξεων και έχει περιγραφεί αντοχή στις τετρακυκλίνες σε στελέχη του πνευμονιοκόκκου πριν από το 1974 (Wyres και συν., 2013).

Η αντοχή του πνευμονιόκοκκου στις τετρακυκλίνες οφείλεται στην προστασία της υποομάδας 30S του ριβοσώματος, όπου εμποδίζεται η σύνδεση του αντιβιοτικού με τις ριβοσωμικές πρωτεΐνες κυρίως tetM και σπανιότερα tetO, οι οποίες κωδικοποιούνται από τα αντίστοιχα γονίδια *tet*(M) και *tet*(O) που εντοπίζονται σε ένα τρανσποζόνιο (Widdowson και συν., 1996, Connell και συν., 2003). Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι σε ανθεκτικά στις τετρακυκλίνες στελέχη πνευμονιοκόκκου ανακαλύφθηκαν δύο διαφορετικά τρανσποζόνια *Tn*916-like και *tet*(M)-containing elements) (Wyres και συν., 2013). Αυτά τα τρανσποζόνια συχνά φέρουν και άλλα γονίδια αντοχής όπως *erm*(B) που κωδικοποιεί για αντίσταση στις μακρολίδες, λινκοσαμίδες και στρεπτογραμίνες τύπου B, γεγονός που εξηγεί την συνεχιζόμενη αντοχή στις τετρακυκλίνες (αφού αυτά τα τρανσποζόνια εξακολουθούν να επιλέγονται από τη χρήση των μακρολιδών). Σύγκριση των *tet*(M) αλληλουχιών σε πολυανθεκτικά στελέχη δείχνουν σε μεγάλο βαθμό αλληλόμορφες παραλλαγές. Υπάρχει ένδειξη εξάπλωσης κλώνων με επιλεγμένες αλληλόμορφες αλληλουχίες, καθώς και οριζόντια εξάπλωση στελεχών που μεταφέρουν *tet*(M) (Dzierzanowska-Fangrat και συν., 2006).

4.9 Αντοχή στη χλωραμφενικόλη

Η αντοχή του πνευμονιοκόκκου στη χλωραμφενικόλη οφείλεται στην ακετυλίωση του αντιβιοτικού από την παραγωγή του ενζύμου ακετυλοτρανσφεράση της χλωραμφενικόλης (CAT). Το γονίδιο *cat* στον πνευμονιόκοκκο φέρεται σε ένα σύνθετο τρανσποζόνιο *Tn*5253, το οποίο αποτελείται από το τρανσποζόνιο αντοχής στην τετρακυκλίνη, *Tn*5251 και *Tn*5252, που μεταφέρει τον παράγοντα αντοχής στη χλωραμφενικόλη. Τα ανθεκτικά στη χλωραμφενικόλη στελέχη φαίνεται ότι περιέχουν ομόλογες ακολουθίες προς το cat_{pC194} και άλλες πλευρικές αλληλουχίες από το πλασμίδιο pC194 του *Staphylococcus aureus* (Widdowson και συν., 2000).

4.10 Αντοχή στην τριμεθοπρίμη/σουλφαμεθοξαζόλη

Η τριμεθοπρίμη και σουλφαμεθοξαζόλη χρησιμοποιούνται ευρέως σε συνδυασμό ως κοτριμοξαζόλη. Η κοτριμοξαζόλη έχει χρησιμοποιηθεί στη θεραπεία πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων, ειδικά στα παιδιά, επειδή είναι φθηνή και γενικά αποτελεσματική. Αντοχή του πνευμονιοκόκκου στην κοτριμοξαζόλη έχει αυξηθεί σημαντικά σε παγκόσμιο επίπεδο. Πρόσφατα στοιχεία επιτήρησης από διάφορες μελέτες δείχνουν ποσοστά αντοχής που

κυμαίνονται από 19% στην Ευρώπη, σε περίπου 50% σε περιοχές της Αφρικής, όπου είναι αυξημένη η επίπτωση της HIV λοίμωξης και υψηλότερα από 60% στην Ασία.

Η αντοχή στην κοτριμοξαζόλη σχετίζεται συχνά με αντοχή και σε άλλα αντιβιοτικά, ειδικά στην πενικιλλίνη. Η αντοχή του πνευμονιοκόκκου στην τριμεθοπρίμη έχει περιγραφεί ότι οφείλεται στην απλή αντικατάσταση ενός αμινοξέος (Ile-100-Leu) στην πρωτεΐνη της διυδροφολικής αναγωγάσης (DHFR) (Adrian και συν., 1997) και σχετίζεται συχνά με αλληλομορφία μωσαϊκού. Πρόσθετες μεταλλάξεις που φαίνεται να ενισχύουν την αντοχή έχουν επίσης αναφερθεί (Maskell και συν., 2001). Σε πολλές περιπτώσεις, η αντίσταση στις σουλφοναμίδες σχετίζεται με χρωμοσωμικές μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί τη διυδροπτερική συνθετάση (DHPS). Διάφορες μελέτες έχουν δείξει μεταλλάξεις σε ένα ή πολλαπλά αμινοξέα στη DHPS των ανθεκτικών στις σουλφοναμίδες στελεχών του πνευμονιοκόκκου (Padayachee και συν., 1999).

4.11 Αντοχή στη ριφαμπικίνη

Η χρήση της ριφαμπικίνης σε συνδυασμό είτε με β-λακταμικά αντιβιοτικά ή με βανκομυκίνη συνιστάται για τη θεραπεία της μηνιγγίτιδας από πολυανθεκτικά στελέχη πνευμονιοκόκκου. Η αντοχή του πνευμονιοκόκκου στη ριφαμπικίνη προς το παρόν είναι χαμηλή και κυμαίνεται μεταξύ 0,1% και 1,5%. Αντοχή στην ριφαμπικίνη έχει περιγραφεί σε διάφορα είδη μικροβίων και οφείλεται σε μεταλλάξεις στη β υποομάδα της RNA πολυμεράσης που είναι ο στόχος για το αντιβιοτικό. Η αντοχή του πνευμονιοκόκκου στη ριφαμπικίνη έχει συνδεθεί με μεταλλάξεις του γονιδίου *rpo*B της πολυμεράσης, που κωδικοποιεί την β υποομάδα (Ferrandiz και συν., 2005).

4.12 Αντοχή στις οξαζολιδινόνες

Η λινεζολίδη είναι το πρώτο αντιβιοτικό στην κατηγορία των οξαζολιδινονών που εγκρίθηκε για κλινική χρήση το 2000, για τη θεραπεία της νοσοκομειακής και εξωνοσοκομειακής πνευμονίας. Η λινεζολίδη δεσμεύεται στην 23S rRNA υποομάδα του 50S ριβοσώματος και εμποδίζει τον σχηματισμό του 70S συμπλέγματος. Αντοχή του πνευμονιοκόκκου στην λινεζολίδη είναι εξαιρετικά σπάνια (Farrell και συν., 2004). Έχει περιγραφεί σποραδικά σε στελέχη εντεροκόκκου και σταφυλοκόκκου και οφείλεται σε μετάλλαξη των ριβοσωμιακών πρωτεϊνών (23S rRNA) στις οποίες δεσμεύεται η λινεζολίδη (Meka και Gold, 2004).

Το 2005 ο Wolter και συν. περιέγραψαν δύο στελέχη πνευμονιοκόκκου με μειωμένη ευαισθησία (MICs 4 mg/L) στη λινεζολίδη, τα οποία βρέθηκαν να περιέχουν απώλεια (deletions) 6-pb στο γονίδιο που κωδικοποιεί τη ριβοσωμική πρωτεΐνη L4. Διαγραφές στη L4 βρέθηκαν επίσης να προσδίδουν ένα νέο μηχανισμό με ταυτόχρονη αντοχή στις μακρολίδες, οξαζολιδινόνες και χλωραμφαινικόλη (Wolter και συν., 2005).

Σε πρόσφατη μελέτη από το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων των ΗΠΑ (CDC) περιγράφηκαν δύο στελέχη με μειωμένη ευαισθησία στη λινεζολίδη με μεταλλάξεις και διαγραφές στο γονίδιο *rpl*D (Dong και συν., 2014). Πλήρης προσδιορισμός της αλληλουχίας του γονιδιώματος μεταλλαγμένων in vitro στελεχών ανθεκτικών στη λινεζολίδη έδειξε ότι ρόλο στην αντοχή έχει η μεθυλοτρανσφεράση του γονιδίου 23SrRNA (spr0333) και οι πρωτεΐνες PatA και PatB (Feng και συν., 2009). Δεύτερης γενιάς οξαζολιδινόνες, όπως η tedizolid, η οποία κυκλοφόρησε πρόσφατα και είναι αναστολέας της σύνθεσης των πρωτεϊνών, έχει αποδειχθεί να έχει ισχυρή in vitro δραστικότητα έναντι ανθεκτικών στη πενικιλλίνη στελεχών *S. pneumoniae* (Kisgen και συν., 2014)

4.13 Αντοχή στη βανκομυκίνη

Η βανκομυκίνη και η τεϊκοπλανίνη είναι γλυκοπεπτίδια που αναστέλλουν στο δεύτερο ή όψιμο στάδιο την σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος της πεπτιδογλυκάνης των ευαίσθητων σε αυτά μικροβίων. Αντοχή στη βανκομυκίνη δεν έχει περιγραφεί σε στελέχη πνευμονιοκόκκου (Reynolds 1989, Zhanel και συν., 2003). Σπάνια έχουν περιγραφεί στελέχη με ανοχή (tolerant) στη βανκομυκίνη, δηλαδή στελέχη ικανά να επιβιώνουν, αλλά να μην πολλαπλασιάζονται παρουσία του αντιβιοτικού (Gillis, 2005, Novak και συν., 1999, Ortega και συν., 2003). Αντιβιοτικά δραστικά έναντι στελεχών πνευμονιοκόκκου με ανοχή στην βανκομυκίνη είναι η μοξιφλοξασίνη, η λινεζολίδη και η λινεζολίδη μαζί με ριφαμπικίνη (Cha και Rybak., 2003, Rodriguez-Cerrato και συν., 2003).

5. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Η παθογένεια των πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων περιλαμβάνει πολύπλοκη αλληλεπί-δραση μεταξύ των λοιμογόνων παραγόντων του μικροβίου που αποικίζει το ρινοφάρυγγα και της άμυνας του ξενιστή με αποτέλεσμα τέσσερεις σημαντικές επιπτώσεις, την προσκόλληση του μικροβίου στα κύτταρα του ξενιστή, την εισβολή του στον ανθρώπινο οργανισμό, την

πρόκληση φλεγμονής ή νόσου και την κατάρριψη ή “shock” όταν η λοιμογόνος δύναμη του μικροβίου είναι ισχυρή και η θεραπευτική παρέμβαση δεν είναι έγκαιρη.

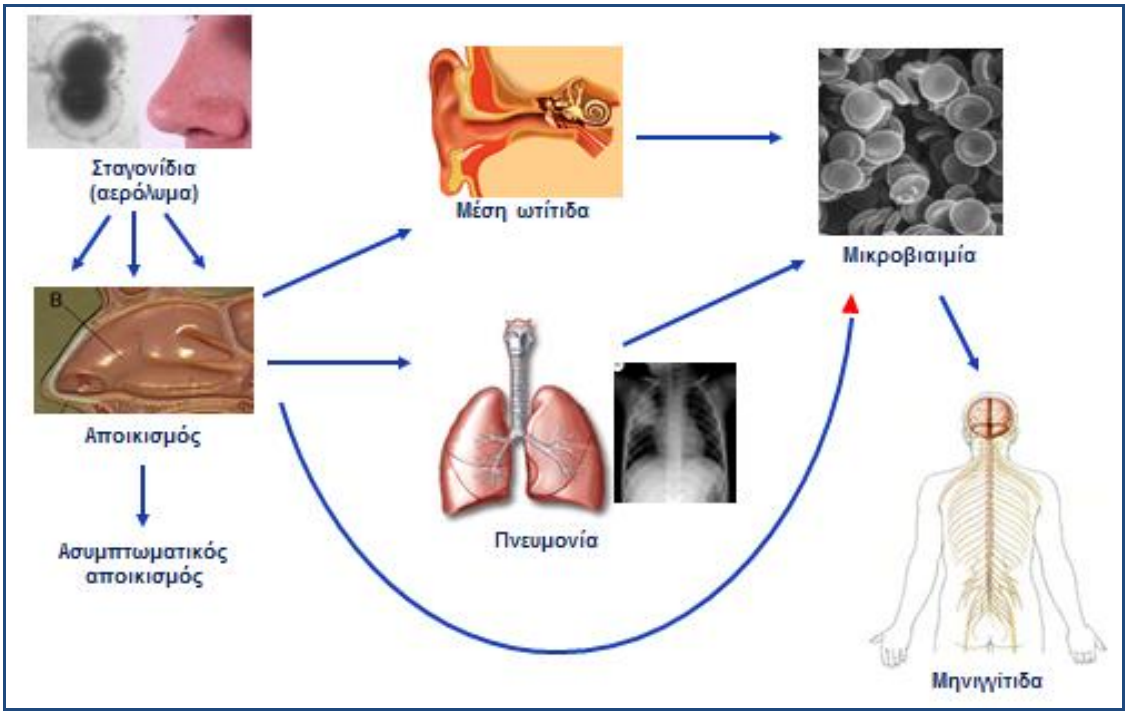
Ο πνευμονιόκοκκος αποικίζει συχνά τον ανθρώπινο ρινοφάρυγγα από τις πρώτες εβδομάδες της ζωής, αλλά προκαλεί νόσο σχετικά σπάνια. Ο αποικισμός είναι συνήθως ασυμπτωματικός και σπάνια συνοδεύεται από ήπια αναπνευστικά συμπτώματα σε πολύ μικρά παιδιά. Στο ρινοφάρυγγα το μικρόβιο επιβιώνει στη βλέννα που εκκρίνεται από τα επιθηλιακά κύτταρα και μπορεί να διαφύγει από τους τοπικούς αμυντικούς μηχανισμούς, όπως τα λευκοκύτταρα και το συμπλήρωμα. Τα επεισόδια αποικισμού με πνευμονιόκοκκο είναι συχνά και μικρής διάρκειας (1-4 εβδομάδων). Ο αποικισμός σπάνια παρατείνεται με τον ίδιο ορότυπο για πολλούς μήνες (Janoff και Musher, 2015), οπότε στις περιπτώσεις αυτές αναπτύσσονται ειδικά IgG αντισώματα έναντι της κάψας του συγκεκριμένου ορότυπου, που παίζουν ρόλο διαμεσολάβησης και κάθαρσης των βακτηρίων από το φάρυγγα. Πρόσφατος αποικισμός με κάποιο ορότυπο είναι πιο πιθανό να σχετίζεται με επακόλουθη εισβολή και εκδήλωση νόσου, πιθανώς λόγω έλλειψης ειδικής ανοσίας (Bogaert και συν., 2004, Goldblatt και O’Brien, 2015, Janoff και Musher, 2015).

Ιογενείς λοιμώξεις ευνοούν τον αποικισμό και την εκδήλωση πνευμονιοκοκκικής νόσου γιατί προκαλούν συχνά διαταραχή του ρινοφαρυγγικού βλεννογόνου και τοπική παραγωγή κυτοκινών που επιτρέπουν στο πνευμονιόκοκκο να προσκολληθεί στο αναπνευστικό επιθήλιο μέσω των επιφανειακών μορίων προσκόλλησης συμπεριλαμβανομένων των PsaA, PspA, CbpA, PspC, Hyl, της πνευμονιολυσίνης και της νευραμινιδάσης.

Μετά την προσκόλληση σε συνδυασμό με τη φλεγμονή που προκαλείται από πρωτεΐνες του πνευμονιοκόκκου, όπως πεπτιδογλυκάνη και τειχοϊκό οξύ και από ποικιλία άλλων προφλεγμονωδών κυτοκινών ιντερλευκίνης, IL-1, IL-6 και παράγοντα νέκρωσης του όγκου, ενεργοποιείται το συμπλήρωμα μέσω της εναλλακτικής οδού. Έτσι προσελκύονται τα πολυμορφοπύρηνα λευκοκύτταρα και αρχίζει έντονη φλεγμονώδης αντίδραση που ευνοεί την εισβολή. Η πνευμονιολυσίνη παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στην τοπική φλεγμονή επάγοντας την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών από τα μονοκύτταρα. Πολλοί άλλοι λοιμογόνοι παράγοντες του μικροβίου έχουν περιγραφεί με την κάψα να παραμένει ο πιο σημαντικός. Ο πολυσακχαρίτης της κάψας παρέχει προστασία του μικροβίου από τη φαγοκυττάρωση και επίσης αναστέλλει την ενεργοποίηση του συμπληρώματος διαμέσου της εναλλακτικής οδού (Donkor και Badoe, 2014, Goldblatt και O’Brien, 2015, Henriques-Normark και Tuomanen, 2013, Hyams 2010, Janoff και Musher, 2015). Αν και οι

περισσότεροι ορότυποι μπορούν να προκαλέσουν ασθένεια στον άνθρωπο, ορισμένοι είναι λιγότερο παθογόνοι. Ο λόγος γιατί κυριαρχούν ορισμένοι ορότυποι έναντι άλλων στις ΔΠΝ δεν είναι διασαφηνισμένος, πιθανότατα λόγω της διαφορετικής σύνθεσης του καψικού πολυσακχαρίτη, η ικανότητά τους να αντισταθούν στη φαγοκυττάρωση ποικίλλει με αποτέλεσμα η μολυσματικότητά τους να είναι διαφορετική (Kelly 1994, Magee 2001).

Η εισβολή του μικροβίου στην κυκλοφορία του αίματος μπορεί να προκαλέσει διεισδυτικές λοιμώξεις (μικροβιαιμία, πνευμονία, μηνιγγίτιδα, αρθρίτιδα ή οστεομυελίτιδα, περιτονίτιδα) και τοπικές λοιμώξεις σε βλεννογονικές επιφάνειες (μέση πυώδης ωτίτιδα, ιγμορίτιδα και πνευμονία) (Εικόνα 8). Εξάπλωση κατά συνέχεια ιστού από το ρινοφάρυγγα στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) μπορεί να συμβεί σε σπάνιες περιπτώσεις, όπως σε κάταγμα της βάσης του κρανίου. Ο πνευμονιόκοκκος μπορεί να προκαλέσει λοίμωξη σχεδόν σε οποιοδήποτε όργανο ή μέρος του σώματος, ωστόσο οι παραπάνω λοιμώξεις είναι οι πιο συχνές (Goldblatt και O'Brien, 2015, Henriques-Normark και Tuomanen, 2013, Janoff και Musher, 2015).



Εικόνα 8. Εξέλιξη της πνευμονιοκοκκικής νόσου. Ο πνευμονιόκοκκος μεταδίδεται με αερόλυμα και αποικίζει το ρινοφάρυγγα. Αλληλεπίδραση με τον ξενιστή οδηγεί συνήθως σε εκκαθάριση του αποικισμού ενώ αναπτύσσεται και ειδική ανοσία στον συγκεκριμένο ορότυπο. Εξέλιξη σε ωτίτιδα είναι πολύ συχνή στα παιδιά. Διεισδυτική νόσος αναπτύσσεται με εξάπλωση στους πνεύμονες και το κυκλοφορικό σύστημα. Η σοβαρότερη εξέλιξη είναι η μηνιγγίτιδα (Henriques-Normark και Tuomanen, 2013).

6. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΜΥΝΑΣ ΤΟΥ ΞΕΝΙΣΤΗ

6.1 Έμφυτη ανοσία

Ο ανθρώπινος οργανισμός διαθέτει μια σειρά από μη ειδικούς ή έμφυτους ανοσοποιητικούς παράγοντες (π.χ., βλέννα στο ρινοφάρυγγα, τη λειτουργία του σπλήνα, το συμπλήρωμα, τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα κύτταρα) που αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας έναντι του πνευμονιοκόκκου. Άλλοι φυσικοί παράγοντες όπως ο βήχας και το κροσσωτό επιθήλιο είναι σημαντικά για να αποβάλλουν μικρόβια από τον πνεύμονα. Επίσης και άλλοι ανοσολογικοί παράγοντες είναι ζωτικής σημασίας, όπως η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) η οποία δεσμεύει τη φωσφορυλοχολίνη στο κυτταρικό τοίχωμα του πνευμονιοκόκκου και προκαλεί την ενεργοποίηση του συμπληρώματος και την κάθαρση των μικροβίων. Επιπλέον σε πειραματόζωα έχει δειχθεί ότι η απουσία υποδοχέα Toll-like receptor 2 (TLR2) οδηγεί σε σοβαρή λοίμωξη και ο TLR4 παίζει σημαντικό ρόλο στην προφλεγμονώδη αντίδραση της πνευμονιολυσίνης στα μακροφάγα.

Πρέπει να σημειωθεί ότι ασθενείς που στερούνται σπλήνα ή έχουν λειτουργική ασπληνία (π.χ., τα άτομα με δρεπανοκυτταρική αναιμία) διατρέχουν υψηλό κίνδυνο να αναπτύξουν κεραυνοβόλο πνευμονιοκοκκική νόσο. Ο σπλήνας αποτελείται από λεμφικό ιστό και φαγοκύτταρα και συμμετέχει στη μη ειδική και ειδική άμυνα του οργανισμού. Στη μη ειδική άμυνα συμμετέχει με την παραγωγή ουσιών όπως, οψωνίνες (properdin, tuftsin) και στη δραστηριοποίηση της εναλλακτικής οδού του συμπληρώματος, που βοηθούν στην απομάκρυνση μικροβίων από την κυκλοφορία. Όταν τα μικρόβια ή ιοί επικαλύπτονται με συμπλήρωμα σχηματίζουν συμπλέγματα τα οποία καθαρίζονται από το σπλήνα και το ήπαρ. Στις περιπτώσεις που απουσιάζει ο σπλήνας τα συμπλέγματα αυτά αυξάνονται στην κυκλοφορία.

Στην ειδική άμυνα ο σπλήνας συμμετέχει με την παραγωγή αντισωμάτων IgM και IgG έναντι πολυσακχαριδικών αντιγόνων. Επί σπληνεκτομής η αναγνώριση των πολυσακχαριδικών αντιγόνων, η παραγωγή IgM αντισωμάτων στα αρχικά στάδια της λοίμωξης και η απομάκρυνση μη οψωνινοποιημένων μικροβίων είναι προβληματική, με αποτέλεσμα την εμφάνιση θανατηφόρου σηψαιμίας ή σοβαρών λοιμώξεων. Η ικανότητα του σπλήνα να φαγοκυτταρώνει μη οψωνινοποιημένα σωματίδια και μικρόβια προφανώς οφείλεται στην ιδιομορφία της σπληνικής κυκλοφορίας, που επιτρέπει παρατεταμένη επαφή των σωματιδίων με τα φαγοκύτταρα. Στα άτομα που έχουν ειδικά αντισώματα (IgM ή IgG) και συμπλήρωμα, παράγοντες που προάγουν την οψωνινοποίηση, ο σπλήνας δεν φαίνεται να είναι απαραίτητος γιατί η φαγοκυττάρωση επιτυγχάνεται από το ήπαρ.

6.2 Επίκτητη ανοσία

Η επίκτητη ανοσία αποκτάται με ανάπτυξη IgG αντισωμάτων μετά από επαφή με το μικρόβιο μέσω αποικισμού ή μετά από εμβολιασμό. Η χημική σύνθεση του πολυσακχαρίτη κάθε οροτύπου είναι διαφορετική και επομένως τα αντισώματα που επάγει είναι ειδικά για κάθε πολυσακχαρίτη και σε ελάχιστες περιπτώσεις μπορεί να υπάρχει διασταυρούμενη ανοσία σε οροτύπους της ίδιας οροομάδας. Σχεδόν όλοι οι πολυσακχαρίτες είναι αντιγόνα που η αντισωματική τους απάντηση εξαρτάται από τα Β κύτταρα χωρίς τη βοήθεια των Τ. Ωστόσο, σε παιδιά <2 ετών, τα πολυσακχαριδικά αντιγόνα δεν ανταποκρίνονται ικανοποιητικά, κάτι που δικαιολογεί και τη μεγαλύτερη επίπτωση των πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων, γιατί με τον αποικισμό δεν αναπτύσσουν αντισώματα.

Απουσία ειδικών αντισωμάτων, όπως διαπιστώνεται από άτομα με αγαμμασφαιριναιμία προδιαθέτουν σε εξαιρετικά υψηλό κίνδυνο πνευμονιοκοκκικής λοίμωξης. Η ανάπτυξη πολυσακχαριδικών εμβολίων συζευγμένων με πρωτεΐνη τροποποιεί την παραγωγή των αντισωμάτων μέσω των Τ κυττάρων με αποτέλεσμα η ανοσία να είναι ικανοποιητική ανεξάρτητα από την ηλικία του ατόμου. Αντισώματα έναντι άλλων επιφανειακών πρωτεϊνών του μικροβίου, όπως πνευμονιολυσίνης, PsaA και PspA μπορεί να ανιχνευθούν στον οργανισμό, αλλά η λειτουργική τους σημασία παραμένει ασαφής.

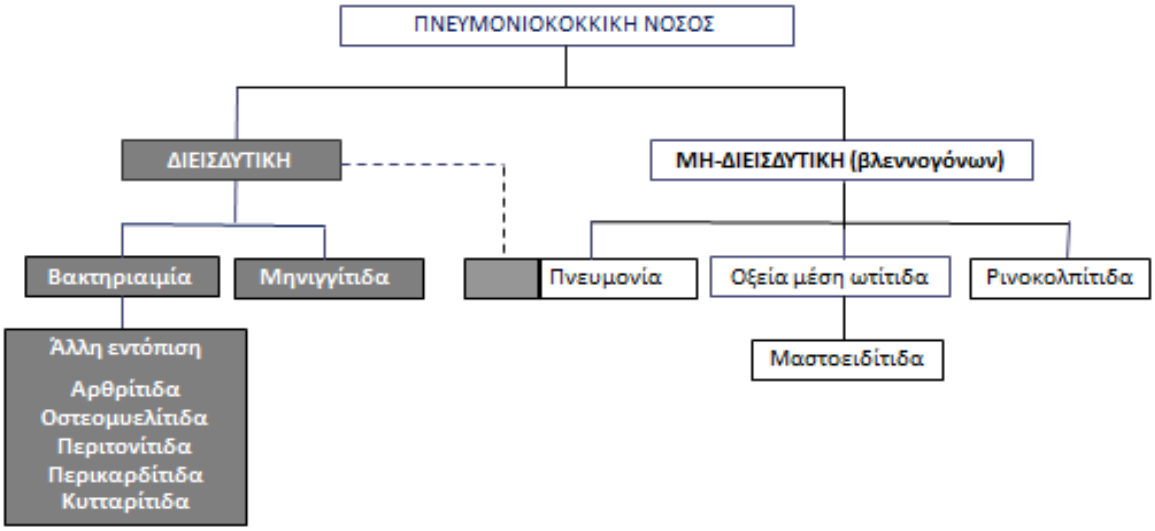
7. ΠΝΕΥΜΟΝΙΟΚΟΚΚΙΚΕΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

Το φάσμα της πνευμονιοκοκκικής νόσου είναι αρκετά ευρύ (Σχήμα 2). Περιλαμβάνει διεισδυτικές λοιμώξεις όπως μικροβιαιμία, μηνιγγίτιδα, πνευμονία με μικροβιαιμία, μαστοειδίτιδα ή άλλη εντόπιση σε οποιοδήποτε ιστό του σώματος και μη διεισδυτικές ή τοπικές λοιμώξεις συχνότερα, όπως πνευμονία χωρίς μικροβιαιμία, ΜΠΩ και παραρινοκολπίτιδα. Οι κλινικές εκδηλώσεις της πνευμονιοκοκκικής νόσου εξαρτώνται από την εντόπιση και τη διάρκεια της νόσου, τα δε συμπτώματα δεν είναι παθογνωμονικά. Για το λόγο αυτό στη διαφορική διάγνωση των κοινών κλινικών συνδρόμων, όπως μηνιγγίτιδας, πνευμονίας, μέσης πυώδους ωτίτιδας και πυρετού αγνώστου αιτιολογίας θα πρέπει πάντα να περιλαμβάνεται και η πνευμονιοκοκκική λοίμωξη. Η διάγνωση με απομόνωση του μικροβίου σε καλλιέργεια αίματος ή άλλου βιολογικού υγρού δεν είναι συχνή, ιδιαίτερα αν έχει προηγηθεί χορήγηση αντιβιοτικών. Έτσι στην εμπειρική αντιμετώπιση των παραπάνω νόσων θα πρέπει να περιλαμβάνεται και κατάλληλη θεραπεία για τον πνευμονιόκοκκο.

Πριν από το 1970, η πενικιλλίνη ήταν το φάρμακο εκλογής για την αντιμετώπιση των πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων γιατί όλα σχεδόν τα στελέχη του πνευμονιοκόκκου αναστέλλονταν in vitro, από πυκνότητα πενικιλλίνης μικρότερη ή ίση με 0,06 μg/mL (επίπεδο συνήθως εφικτό στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό με μέγιστες δόσεις πενικιλλίνης). Στα τέλη του 1970 άρχισαν να εμφανίζονται ανθεκτικά στελέχη και να σημειώνονται κλινικές αποτυχίες στη θεραπεία των πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων με πενικιλλίνη, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις μηνιγγίτιδας (McDougal και συν., 1995, Smith και συν., 2001, von Gottberg και συν., 2008).

Η αντοχή στις κεφαλοσπορίνες 3^{ης} γενιάς (κεφοταξίμη, κεφτριαξόνη) και τη μεροπενέμη αναφέρεται σε μικρότερο ποσοστό από ότι στην πενικιλλίνη και επίσης μέχρι σήμερα δεν έχει αναπτυχθεί αντοχή στην βανκομυκίνη, τεϊκοπλανίνη, μοξιφλοξασίνη, λινεζολίδη και ριφαμπικίνη. Η εμπειρική θεραπεία των πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων συνιστάται να γίνεται με κεφοταξίμη ή κεφτριαξόνη ή μεροπενέμη. Αν υπάρχει αντοχή στις κεφαλοσπορίνες 3^{ης} γενιάς σε 8-10% των στελεχών στην περιοχή να προστίθεται βανκομυκίνη.

Στην εποχή πριν από την εφαρμογή των PCVs οι κύριοι ορότυποι που προκαλούσαν ΔΠΝ ήταν οι: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F και μη διεισδυτικές λοιμώξεις οι: 19F, 6A, 23F. Μετά την ευρεία χρήση του PCV7 συχνότεροι ορότυποι για τις διεισδυτικές λοιμώξεις ήταν οι: 1, 3, 5, 6A, 7F, 19A και μη διεισδυτικές οι: 3, 6A, 19A, 19F, ενώ μετά την εφαρμογή του PCV13 οι ορότυποι 3, 10A, 11A, 15C, και 19A.



Σχήμα 2. Φάσμα διεισδυτικών και μη διεισδυτικών πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων.

7.1. Διεισδυτικές λοιμώξεις

7.1.1 Βακτηριαιμία

Αποτελεί συχνή κλινική εκδήλωση ΔΠΝ στα παιδιά. Λανθάνουσα “occult” βακτηριαιμία απαντούσε στο 4% των περιπτώσεων, πριν από την εφαρμογή των PCVs σε παιδιά 3-36 μηνών με πυρετό χωρίς τοξική εμφάνιση ή εστιακή λοίμωξη. Η διαπίστωση της λανθάνουσας βακτηριαιμίας γινόταν στις περιπτώσεις που λαμβάνονταν καλλιέργειες αίματος ως πρακτική ρουτίνας σε βρέφη με πυρετό, χωρίς εστία λοίμωξης (Teele και συν., 1979). Συχνότερη είναι η νόσος σε παιδιά 6-24 μηνών και ο κίνδυνος για βακτηριαιμία αυξάνει, εάν ο πυρετός είναι ≥39°C. Τα συμπτώματα είναι ήπια και δεν διαφέρουν από την μικροβιαιμία άλλης αιτιολογίας (McCarthy και συν., 1976, McCarthy και συν., 1981). Αυξημένα επίπεδα λευκών αιμοσφαιρίων πάνω από 15.000/mm3 ή απόλυτος αριθμός ουδετερόφιλων πάνω από 5.000/mm3 και αυξημένη ταχύτητα καθίζησης ερυθρών αιμοσφαιρίων (ΤΚΕ) ή αυξημένη προκαλσιτονίνη (PCT) συσχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο για πνευμονιοκοκκική βακτηριαιμία και όλα έχουν κακή προγνωστική αξία (Andreola και συν., 2007).

Η κλινική σημασία της "λανθάνουσας" βακτηριαιμίας χωρίς θεραπεία έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον και μερικοί υποστηρίζουν ότι αποτελεί πρόδρομη εκδήλωση σοβαρής πνευμονιοκοκκικής νόσου, ενώ άλλοι πιστεύουν ότι αυτοπεριορίζεται και δεν έχει ιδιαίτερη κλινική σημασία. Μελέτες έχουν δείξει ότι στο ένα τρίτο των ασθενών αυτοϊάται, ενώ στα δύο τρίτα τα συμπτώματα της νόσου επιμένουν και ακολουθεί ανάπτυξη εστιακής λοίμωξης (Klein 1981, Woods και συν., 1990, Alpern και συν., 2000). Επίμονη βακτηριαιμία και εστιακές λοιμώξεις έχουν συνδεθεί με υψηλότερη θερμοκρασία (μέση τιμή 38,8 °C) μεγαλύτερη αύξηση του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων (18.900 / mm3 έναντι 14.900 / mm3), ηλικία κάτω των 20 μηνών και απουσία χορήγησης αντιβιοτικών (Bachur και Harper, 2000, Alpern και συν., 2000). Επιπλοκές όπως η μηνιγγίτιδα,η πνευμονία, η κυτταρίτιδα, η κυτταρίτιδα κόγχου και η ΜΠΩ, είναι οι συχνότερες εστιακές λοιμώξεις (Alpern και συν., 2000). Η αντιμετώπιση της βακτηριαιμίας ή των επιπλοκών γίνεται όπως αναφέρεται παραπάνω με κεφοταξίμη ή κεφτριαξόνη με ή χωρίς βανκομυκίνη.

7.1.2 Μηνιγγίτιδα

Ο *S. pneumoniae* και η *N. meningitidis,* πριν από την εφαρμογή των PCVs και μετά την ευρεία χρήση του εμβολίου έναντι του αιμόφιλου της ινφλουέντζας, ήταν τα συχνότερα αίτια

μικροβιακής μηνιγγίτιδας στις ΗΠΑ και σε πολλές άλλες χώρες. Η μηνιγγίτιδα μπορεί να εκδηλωθεί ως πρωτοπαθής λοίμωξη μετά από βακτηριαιμία ή ως επιπλοκή άλλων παθήσεων όπως κάταγμα του κρανίου, ΜΠΩ, ή μαστοειδίτιδα. Παρά το γεγονός ότι η μηνιγγίτιδα είναι λιγότερο συχνή σε σχέση με άλλες διεισδυτικές λοιμώξεις (βακτηριαιμία, σηψαιμία, πνευμονία) τα ποσοστά θνητότητας είναι υψηλά και οι νευρολογικές επιπλοκές στους επιζώντες συχνές (Greenwood 1999, Peltola 2001, Pelton και Jacobs, 2014).

Τα κλασικά συμπτώματα της βακτηριακής μηνιγγίτιδας στα μικρά παιδιά περιλαμβάνουν πυρετό, λήθαργο, απώλεια συνειδήσεως, δυσκαμψία του αυχένα, σπασμούς, προβολή της πρόσθιας πηγής και μειωμένη πρόσληψη τροφής. Ενώ στα μεγαλύτερα παιδιά και τους ενήλικες συχνά εμφανίζονται πυρετός, κεφαλαλγία, ναυτία, τοξική εμφάνιση, δυσκαμψία του αυχένα, φωτοφοβία, σπασμοί, σύγχυση, βραδυκαρδία και υπέρταση, ενδεικτικό αυξημένης ενδοκράνιας πίεσης. Η διάρκεια των συμπτωμάτων μέχρι την εισαγωγή του ασθενούς στο νοσοκομείο ποικίλλει. Μπορεί να είναι ολίγων ωρών, στο 20% περίπου των περιπτώσεων ή και μερικών ημερών (Arditi και συν., 1998). Σπασμοί εμφανίζονται στο ένα τέταρτο των παιδιών και λήθαργος ή σηπτικό “shock” στο 11% και 25% αντίστοιχα.

Η διάγνωση της πνευμονιοκοκκικής μηνιγγίτιδας εκτός από την κλινική εικόνα στηρίζεται στην εξέταση του εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ΕΝΥ). Το ΕΝΥ είναι θολερό, τα λευκά αιμοσφαίρια και κυρίως πολυμορφοπύρηνα είναι αυξημένα, η πρωτεΐνη αυξημένη και η συγκέντρωση της γλυκόζης μειωμένη. Για την αναγνώριση του αιτιολογικού παράγοντα γίνονται ειδικές εξετάσεις στο ΕΝΥ όπως καλλιέργεια, χρώση κατά Gram, ανίχνευση αντιγόνου και PCR (Kennedy και συν., 2007, Pelton και Jacobs, 2014). Καλλιέργεια αίματος θετική για *S. pneumoniae*, σε συνδυασμό με κλινική εικόνα μηνιγγίτιδας και συμβατά ευρήματα από το ΕΝΥ, επιβεβαιώνει τη διάγνωση έστω και αν η καλλιέργεια ΕΝΥ είναι στείρα.

Η θνητότητα κυμαίνεται από 6,3% έως ~ 20%, ενώ οι επιπλοκές φθάνουν μέχρι 50% των επιζώντων συμπεριλαμβανομένων της κώφωσης, της υποσκληρίδιας συλλογής, της κοιλιΐτιδας, του υδροκεφάλου, της παράλυσης και της νοητικής υστέρησης στα παιδιά. Τα υψηλότερα ποσοστά θνητότητας και επιπλοκών παρατηρούνται συχνά στις αναπτυσσόμενες χώρες (Schuchat και συν., 1997, Stanek και Mufson, 1999).

Η εμπειρική θεραπεία της πνευμονιοκοκκικής μηνιγγίτιδας περιλαμβάνει 3^{ης} γενιάς κεφαλοσπορίνη (κεφοταξίμη ή κεφτριαξόνη) με βανκομυκίνη ή τεϊκοπλανίνη ή ριφαμπικίνη. Σε περίπτωση μη ικανοποιητικής ανταπόκρισης χορηγείται μοξιφλοξασίνη ή λινεζολίδη. Εάν

διατίθεται η ευαισθησία του στελέχους η θεραπεία τροποποιείται ανάλογα. Για τα βρέφη και τα παιδιά ηλικίας ≥6 εβδομάδων συνιστάται χορήγηση δεξαμεθαζόνης ταυτόχρονα με την πρώτη δόση αντιβιοτικών, αν και το θέμα παραμένει αμφιλεγόμενο.

7.1.3 Πνευμονία

Η πνευμονία είναι συχνή πνευμονιοκοκκική λοίμωξη, μπορεί να προκληθεί μετά από μικροβιαιμία ή μετά από εισρόφηση πνευμονιοκόκκου από τις εκκρίσεις του φάρυγγα. Στις περιπτώσεις που συνοδεύεται με καλλιέργεια αίματος θετική η νόσος θεωρείται διεισδυτική. Από πνευμονιοκοκκική πνευμονία νοσούν συχνότερα τα παιδιά ≤ 5ετών και οι ενήλικες ≥65 ετών, κυρίως τους χειμερινούς μήνες. Η επίπτωση της νόσου ήταν πολύ υψηλή πριν την εφαρμογή των PCVs και άλλαξε δραματικά στις χώρες όπου εφαρμόστηκε συστηματικός εμβολιασμός των παιδιών έναντι του πνευμονιοκόκκου. Στις ΗΠΑ η μείωση ήταν >75% κυρίως για τους οροτύπους που περιλαμβάνονται στα PCVs.

Τα κλινικά συμπτώματα της πνευμονιοκοκκικής πνευμονίας δεν είναι ειδικά και δεν διαφέρουν από πνευμονία άλλης αιτιολογίας. Συνήθως έχουν αιφνίδια έναρξη με βήχα, δύσπνοια, πυρετό, ρίγος, μυαλγίες και μερικές φορές πλευρωδυνία. Στα παιδιά η λοβώδης πνευμονιοκοκκική πνευμονία εκδηλώνεται με υψηλό πυρετό ≥40°C, γενική καταβολή, παραγωγικό βήχα και δύσπνοια, ενώ στα μεγαλύτερα παιδιά μπορεί να συνυπάρχει πόνος στο θώρακα. Ο πυρετός και ο βήχας απαντούν σε ποσοστό 90% και 70% αντίστοιχα. Έντονο κοιλιακό άλγος μπορεί να συνυπάρχει σε ποσοστό 10% έως 50% των ασθενών με λοβώδη πνευμονία αριστερού κάτω λοβού, ενώ σπάνια υπάρχουν μηνιγγικά σημεία σε μικρά παιδιά με πνευμονία της κορυφής του πνεύμονα (Tan και συν., 1998, Pelton και Jacobs, 2014).

Τα παιδιά με πνευμονιοκοκκική πνευμονία έχουν αυξημένα λευκά αιμοσφαίρια περιφερικού αίματος (μέση τιμή 20.800/mm3), υψηλό επίπεδο CRP (μέσος όρος 137 mg/L), υψηλή PCT και διηθήσεις στην ακτινογραφία θώρακος, που εμφανίζονται συχνότερα στα άτομα με θετική καλλιέργεια αίματος, τα οποία νοσούν και πιο σοβαρά. Η υπεζωκοτική συλλογή υγρού είναι συχνή και εμφανίζεται στο 40% των ασθενών, σημαντική όμως είναι μόνο στο 10%, ενώ εμπύημα παρατηρείται στο 2% (Light και συν., 1980, Pelton και Jacobs, 2014). Αρκετές μελέτες αναφέρουν ότι ο πνευμονιόκοκκος αποτελεί το συχνότερο αίτιο εμπυήματος κυρίως σε παιδιά μεταξύ 3 και 5 ετών, οι δε συχνότεροι ορότυποι που ευθύνονται γι' αυτό είναι οι 1, 19A, και 3 (Byington και συν., 2002, Byington και συν., 2006).

Η αιτιολογική διάγνωση της πνευμονίας δεν είναι εύκολη. Η καλλιέργεια αίματος είναι στο 10% των περιπτώσεων θετική. Οι δείκτες λοίμωξης (λευκοκυττάρωση, CRP, PCT) και η ακτινογραφία θώρακος δεν αποτελούν παθογνωμονικές εξετάσεις για τη διάγνωση (Waterer και συν., 1999, Toikka και συν., 1999). Η ανίχνευση αντιγόνου στα ούρα βοηθά στη διάγνωση στους ενήλικες, όπου ο αποικισμός του ρινοφάρυγγα είναι σχετικά χαμηλός και ένα θετικό αποτέλεσμα έχει υψηλή προγνωστική αξία, αλλά δεν ισχύει το ίδιο για τα παιδιά, όπου θετικό αντιγόνο πνευμονιοκόκκου στα ούρα μπορεί να αντανακλά αποικισμό. Η αναρρόφηση πλευριτικού υγρού από την πάσχουσα περιοχή του πνεύμονα για καλλιέργεια, ανίχνευση αντιγόνου ή PCR αυξάνει σημαντικά τη διάγνωση αλλά δεν αποτελεί τακτική ρουτίνας και δεν εφαρμόζεται συχνά (Casado και συν., 2010, Pelton και Jacobs, 2014).

Στην πριν από τα αντιβιοτικά εποχή η φυσική πορεία της πνευμονιοκοκκικής πνευμονίας αποτελείτο από 7 έως 9 ημέρες στάσιμη κατάσταση των συμπτωμάτων, ακολουθούσε επιδείνωση με υψηλή θνητότητα κατά το στάδιο αυτό και μετά απυρεξία, εφίδρωση, πολυουρία, βραχύ στάδιο πυρετού και ίασης (Austrian 1981, Ort και συν., 1983). Σήμερα, μετά τη διάθεση των αντιβιοτικών και εμβολίων, το ποσοστό θνητότητας στις ανεπτυγμένες χώρες είναι εξαιρετικά χαμηλό (<1%), ακόμη και σε περιπτώσεις πνευμονίας με βακτηριαιμία και οι επιπλοκές σπάνιες (Black και συν., 2002a, Kaplan και συν., 2002).

Η εμπειρική αντιμετώπιση γίνεται με 3^{ης} γενιάς κεφαλοσπορίνη (κεφοταξίμη ή κεφτριαξόνη) με/ή χωρίς βανκομυκίνη ή τεϊκοπλανίνη. Τροποποίηση της θεραπείας γίνεται όταν απομονώνεται το μικρόβια και διατίθεται η ευαισθησία του.

7.1.4 Οξεία μαστοειδίτιδα

Η οξεία μαστοειδίτιδα είναι η πιο συχνή επιπλοκή της μέσης πυώδους ωτίτιδας, η οποία μειώθηκε μετά τη συστηματική αντιμετώπιση της ΜΠΩ με αντιβιοτικά και τον εμβολιασμό των παιδιών έναντι του πνευμονιοκοκκόκου (Dagan και συν., 1992, Ongkasuwan και συν., 2008). Ο πνευμονιόκοκκος αποτελεί το πιο συχνό αίτιο της οξείας μαστοειδίτιδας στα παιδιά. Απομονώνεται σε ποσοστό 25% - 46% των περιπτώσεων με θετική καλλιέργεια πύου από τη μαστοειδή απόφυση (Hoppe και συν., 1994). Οι συχνότεροι ορότυποι πριν από την εφαρμογή των PCVs ήταν οι: 6B, 9V, 14, 19F και 23F και μετά οι: 1, 3, 6A, 7F και 19A. Πολυανθεκτικά στελέχη και κυρίως ο ορότυπος 19A, που προκαλούν μαστοειδίτιδα απομονώνονται συχνά μετά την χρήση του PCV7 (Ongkasuwan και συν., 2008, Koutouzis και συν., 2016).

Η διαγνωστική προσέγγιση γίνεται με λήψη πύου μετά από σύστοιχη μυριγγοτομή ή παροχέτευση από την πάσχουσα περιοχή της μαστοειδούς και εξέταση με καλλιέργεια, χρώση κατά Gram, ανίχνευση αντιγόνου της κάψας με ταχείες τεχνικές και PCR. Η εμπειρική αντιμετώπιση, λόγω υψηλού ποσοστού πολυανθεκτικών στελεχών που ευθύνονται για την νόσο, αρχίζει με 3^{ης} γενιάς κεφαλοσπορίνη (κεφοταξίμη ή κεφτριαξόνη) συνήθως μαζί με βανκομυκίνη ή τεϊκοπλανίνη. Τροποποίηση της θεραπείας γίνεται μετά τα αποτελέσματα της ευαισθησίας του μικροβίου, αν απομονωθεί στην καλλιέργεια.

7.1.5 Άλλες διεισδυτικές λοιμώξεις

Ο πνευμονιόκοκκος μπορεί να εντοπιστεί σε οποιοδήποτε ιστό του οργανισμού και να προκαλέσει διάφορες άλλες διεισδυτικές λοιμώξεις, όπως οστεομυελίτιδα, σηπτική αρθρίτιδα, ενδοκαρδίτιδα, περικαρδίτιδα και περιτονίτιδα. Η διαγνωστική προσέγγιση στις παραπάνω αναφερόμενες ΔΠΝ είναι η λήψη υλικού με στείρες συνθήκες από το σημείο της λοίμωξης και εξέταση με καλλιέργεια, χρώση κατά Gram και ανίχνευση αντιγόνου της κάψας με ταχείες τεχνικές ή PCR. Η εμπειρική αντιμετώπιση γίνεται με 3^{ης} γενιάς κεφαλοσπορίνη (κεφοταξίμη ή κεφτριαξόνη) με ή χωρίς βανκομυκίνη ή τεϊκοπλανίνη. Τροποποίηση της θεραπείας γίνεται όταν απομονώνεται το μικρόβια και διατίθεται η ευαισθησία του.

7.2 Μη διεισδυτικές ή βλεννογονικές λοιμώξεις

7.2.1 Μέση πυώδης ωτίτιδα (ΜΠΩ)

Ο συχνότερος αιτιολογικός παράγοντας της μέσης πυώδους ωτίτιδας στα παιδιά είναι ο πνευμονιόκοκκος, ο οποίος ευθύνεται για το 25%-60% των περιπτώσεων, ακολουθεί ο αιμόφιλος της ινφλουέντζας 20-30%, η μοραξέλλα η καταροϊκή και σπανιότερα άλλα μικροβιακά αίτια (Dowel και συν., 1999, Pelton και Jacobs, 2014). Η νόσος εκδηλώνεται συνήθως μετά από ιογενή λοίμωξη του ανώτερου αναπνευστικού και πιστεύεται ότι αντικατοπτρίζει πρόσφατο αποικισμό με τον ορότυπο του πνευμονιοκόκκου (Teele και συν., 1989, Uhari και συν., 1996). Η έναρξη των συμπτωμάτων είναι οξεία με έντονο πόνο, κλάμα, ανησυχία και πυρετό. Κλινικά ευρήματα περιλαμβάνουν ερυθρότητα και προβολή του τυμπανικού υμένα με μειωμένη κινητικότητα μετά την εμφύσηση αέρα. Η ερυθρότητα μόνο του τυμπανικού υμένα δεν είναι επαρκής για τη διάγνωση της μέσης πυώδους ωτίτιδας.

Η έκβαση της νόσου είναι λιγότερο ευνοϊκή, όταν το αίτιο είναι ο πνευμονιόκοκκος και δεν αντιμετωπισθεί σωστά, σε σχέση με άλλα μικρόβια που προκαλούν ωτίτιδα (Klein 1994, Musher και Dagan, 2000, Olson και Jackson, 1999). Επίσης αυτόματη υποχώρηση της λοίμωξης συμβαίνει λιγότερο συχνά, σε σχέση με μέση πυώδη ωτίτιδα άλλης αιτιολογίας και η διάτρηση της μεμβράνης του τύμπανου παρατηρείται πιο συχνά σε πνευμονιοκοκκικής αιτιολογίας ωτίτιδα.

Η αντιμετώπιση με άμεση χορήγηση αντιβιοτικών ή παρακολούθηση με παυσίπονα βασίζεται στη βέβαιη ή πιθανή διάγνωση της οξείας μέσης πυώδους ωτίτιδας, ανάλογα με την ηλικία του ασθενούς και τα κλινικά συμπτώματα και ευρήματα. Στις περιπτώσεις με ήπια νόσο και πιθανή μικροβιακή ωτίτιδα χορηγείται θεραπεία στα παιδιά 6 μηνών έως 2 ετών, ενώ στα μεγαλύτερα συστήνεται παρακολούθηση και επανεξέταση μετά από 48 με 72 ώρες. Σε παιδιά ηλικίας >2 ετών αρχίζει άμεσα η αντιμικροβιακή θεραπεία όταν τα κλινικά συμπτώματα είναι έντονα (ωταλγία, υψηλός πυρετός, επηρεασμένη η γενική κατάσταση) και η διάγνωση της μικροβιακής ωτίτιδας είναι βέβαιη.

Συνιστάται έναρξη θεραπείας με αμοξικιλλίνη (80-90 mg /kg ανά ημέρα) και επανεξέταση σε 48 με 72 ώρες για την εκτίμηση της πορείας της νόσου. Στις περιπτώσεις με ικανοποιητικό αποτέλεσμα η αμοξικιλλίνη συνεχίζεται για 7-10 ημέρες, διαφορετικά τροποποιείται σε αμοξικιλλίνη/κλαβουλανικό ή άλλο αντιβιοτικό ανάλογα με το τεστ ευαισθησίας αν διατίθεται. Η μυριγγοτομή ή τυμπανοκέντηση γίνεται σε σοβαρές περιπτώσεις, εάν δεν ανταποκρίνονται στα αντιβιοτικά και πολλές φορές προκειμένου να ληφθούν δείγματα για καλλιέργεια. Η επίπτωση της ΜΠΩ μειώθηκε μετά την εισαγωγή του PCV7 το 2000 στις ΗΠΑ και το 2001 στην Ευρώπη αλλά στη συνέχεια αυξήθηκε, λόγω της ανάδυσης παθογόνων στελεχών και μάλιστα πολυανθεκτικών, όπως ο ορότυπος 19A και άλλοι (11A, 10A) (Casey και συν., 2010). Η εισαγωγή των PCV10 και PCV13 το 2009 και 2010 αντίστοιχα όπως αναμενότανε ανέστρεψε εν μέρει την αύξηση αυτή (Strutton και συν., 2012).

7.2.2 Παραρινοκολπίτιδα

Μελέτες δείχνουν ότι 5% έως 10% των λοιμώξεων του ανώτερου αναπνευστικού επιπλέκονται με παραρινοκολπίτιδα, η οποία χαρακτηρίζεται από επιμονή ρινόρροια, χαμηλό πυρετό, οίδημα του προσώπου (συνήθως εντοπίζεται στον οφθαλμικό κόγχο) και σε πολλές περιπτώσεις από επίμονο βήχα κατά τις νυχτερινές ώρες. Τα συμπτώματα αυτά

παρατείνονται συνήθως πέραν των 10 ημερών και ως επί το πλείστον σχετίζονται με την ηλικία του ατόμου. Ο πνευμονιόκοκκος είναι το πιο συχνό παθογόνο αίτιο που προκαλεί παραρινοκολπίτιδα σε ποσοστό 35% έως 42% των περιπτώσεων. Η διάγνωση είναι κλινική, και μόνο σε σοβαρές περιπτώσεις ή αυτές που επιμένουν, απαιτείται απεικονιστικός έλεγχος με τομογραφία.

8. ΕΜΒΟΛΙΑ

8.1 Πολυσακχαριδικά εμβόλια (PPSVs)

Η ανάπτυξη αποτελεσματικού εμβολίου έναντι των πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων απασχόλησε για πολλά χρόνια τους ερευνητές. Η πρώτη κλινική δοκιμή με ολοκυτταρικό πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο (νεκρά μικρόβια) για την πρόληψη της πνευμονικοκοκκικής πνευμονίας έγινε το 1911 από τους Wright και συν. οι οποίοι εμβολίασαν με νεκρά μικρόβια πνευμονιοκόκκου μεταλλωρύχους χρυσού στη Ν. Αφρική, άτομα ιδιαίτερα ευπαθή στις πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις (Austrian 1977b, Makela και Butler, 2008).

Η διαπίστωση από τους Francis και Tillett, το 1930, ότι οι πολυσαγχαρίτες της κάψας του πνευμονιόκοκκου έχουν αντιγονική δράση και προκαλούν την παραγωγή ειδικών αντισωμάτων σε πειραματόζωα, αποτέλεσε σημαντική πρόοδο για την ανάπτυξη εμβολίου. Η ανακάλυψη αυτή οδήγησε στην παρασκευή και κλινική εφαρμογή πολυσακχαριδικής προέλευσης εμβολίων με συνδυασμό δύο, τεσσάρων ή και έξι αντιγόνων διαφορετικών οροτύπων πνευμονιοκόκκου, δύο από τα οποία (6-δύναμα) κυκλοφόρησαν στις ΗΠΑ μετά το 2^{ο} παγκόσμιο πόλεμο (Macleod και συν., 1945). Η ευρεία όμως χρήση της πενικιλλίνης, κατά την ίδια περίοδο, μείωσε το ενδιαφέρον για την πρόληψη των πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων, με αποτέλεσμα να διακοπεί και η παραγωγή του εμβολίου.

Δεκαπέντε όμως χρόνια αργότερα, οι Austrian και συν. επεσήμαναν ότι η αυξημένη νοσηρότητα και θνητότητα στις πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις παρέμενε (Austrian 1964, Austrian και συν., 1976). Το γεγονός αυτό καθώς και η απομόνωση ανθεκτικών στην πενικιλλίνη στελεχών αναζωπύρωσαν το ενδιαφέρον για εμβόλιο. Έτσι στα μέσα της δεκαετίας του 1970 παρασκευάζονται εμβόλια με το συνδυασμό πολυσακχαριτών και μετά την κλινική εφαρμογή 8-δύναμου, 12-δύναμου και 13-δύναμου εμβολίου κυκλοφόρησε το

1977 στις ΗΠΑ το 14-δύναμο πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο (Pneumovax, Merck Sharp & Dohme) (Butler και συν., 1999, Robbins και συν., 1983).

Το14-δύναμο εμβόλιο αποτελείται από 50 μg ανά 0,5 mL από κάθε πολυσακχαριδικό αντιγόνο της κάψας των πνευμονιοκοκκικών οροτύπων: 1, 2, 3, 4, 6A, 7F, 8, 9N, 12F, 14, 18C, 19F, 23F και 25. Η επιλογή των οροτύπων αυτών, μεταξύ των 83 μέχρι τότε γνωστών, έγινε βάσει επιδημιολογικών μελετών, που έδειξαν ότι οι 14 αυτοί ορότυποι είναι υπεύθυνοι για το 70-80% των περιπτώσεων μικροβιαιμίας και μηνιγγίτιδας (Austrian 1977a, Austrian 1981).

Νεώτερα επιδημιολογικά στοιχεία, για την κατανομή των παθογόνων οροτύπων του πνευμονιοκόκκου, σε παγκόσμια κλίμακα, έδειξαν ότι εξίσου σημαντικοί για σοβαρές λοιμώξεις είναι και οι ορότυποι: 5, 6B, 9V, 10A, 11A, 15B, 17F, 19A, 20, 22F και 33F. Οι πληροφορίες αυτές, όπως και η καλύτερη γνώση της διασταυρούμενης ανοσολογικής απάντησης μεταξύ των διαφόρων πολυσακχαριδικών αντιγόνων, οδήγησαν στην σύνθεση 23-δύναμου εμβολίου (Robbins και συν., 1983). Το εμβόλιο αυτό αποτελείται από πολυσακχαριδικά αντιγόνα της κάψας των 23 οροτύπων του πνευμονιοκόκκου (1, 2, 3, 4, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F και 33F), που είναι υπεύθυνοι για το 87% των περιπτώσεων μικροβιαιμίας. Κάθε δόση του 23-δύναμου εμβολίου (0,5mL) περιέχει 25μg από κάθε πολυσακχαριδικό αντιγόνο, δηλαδή μισή ποσότητα από αυτή που περιέχει το 14-δύναμο εμβόλιο. Η μείωση αυτή δεν φαίνεται να επηρεάζει την αντισωματική απάντηση, γι’αυτό και θεωρήθηκε απαραίτητη, λόγω του μεγάλου αριθμού των αντιγόνων που περιλαμβάνει το εμβόλιο. Το 23-δύναμο εμβόλιο κυκλοφόρησε το 1983 στις ΗΠΑ (Pneumovax 23, Merck Sharp & Dohme, Pnu-Imune 23, Lederle, Pneumo-23 Sanofi Pasteur SA) (Butler και συν., 1999).

Τα πολυσακχαριδικά εμβόλια δεν είναι ανοσογονικά σε άτομα μικρότερα των δύο ετών, λόγω της χαμηλή ικανότητάς τους να επάγουν Th1 απάντηση (Marchant και Goldman, 2005). Συνιστώνται για τον εμβολιασμό ατόμων >2 ετών, με χρόνια νοσήματα ή καταστάσεις που προδιαθέτουν σε πνευμονιοκοκκική πνευμονία και μικροβιαιμία, ιδιαίτερα σε ομάδες με αυξημένη θνητότητα στις πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις, εφ’ όσον τα άτομα αυτά είναι ικανά να αναπτύξουν αντισώματα στο εμβόλιο (Douglas και συν., 1983, Leinonen και συν., 1986). Άτομα με σπληνεκτομή ή λειτουργική ασπληνία (δρεπανοκυτταρική αναιμία), αλκοολισμό, χρόνια πνευμονοπάθεια, καρδιακή ανεπάρκεια, κίρρωση ήπατος, σακχαρώδη διαβήτη, νεφρωσικό σύνδρομο και νεφρική ανεπάρκεια πρέπει να εμβολιάζονται. Ο εμβολιασμός

ατόμων πάνω από 64 ετών επίσης ενδείκνυται λόγω της αυξημένης νοσηρότητας και θνητότητα από πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις.

Άτομα με ανοσολογική διαταραχή, όπως αυτά με πολλαπλούν μυέλωμα, λευχαιμία, υπογαμασφαιριναιμία, νόσο του Hodgkin υπό θεραπεία με κυτταροστατικά ή ακτινοβολίες και άτομα με μεταμόσχευση οργάνων, αν και είναι επίνοσα σε πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις, μπορεί να μην αναπτύσσουν αντισώματα στο εμβόλιο λόγω της ανοσοκαταστολής και να μην προφυλάσσονται ικανοποιητικά. Γι' αυτό το εμβόλιο πρέπει ή να χορηγείται δύο εβδομάδες πριν από τη θεραπεία με ανοσοκατασταλτικά ή από προγραμματισμένη σπληνεκτομή, ή να επαναλαμβάνεται 3-4 μήνες μετά τη διακοπή των ανοσοκατασταλτικών.

Το 23-δύναμο εμβόλιο, ανεξάρτητα από την ηλικία, χορηγείται υποδόρια ή ενδομυϊκά σε μία δόση 0,5 mL, η οποία περιέχει 0,25 μg από κάθε πολυσακχαριδικό αντιγόνο των 23 οροτύπων που περιέχει. Επανεμβολιασμός μπορεί να γίνει μία φορά 4-5 χρόνια μετά την πρώτη δόση. Μετά τον εμβολιασμό συχνά παρατηρούνται ήπιες, παροδικές, τοπικές αντιδράσεις, όπως ερυθρότητα, διόγκωση και ελαφρός πόνος στο σημείο του εμβολιασμού (Schwartz, 1982). Οι γενικευμένες αντιδράσεις δεν είναι συχνές και σπάνια είναι σοβαρές. Πυρετός, μυαλγίες και έντονες τοπικές αντιδράσεις αναφέρονται σε 1% των εμβολιασθέντων. Ο επανεμβολιασμός αυξάνει τη συχνότητα σοβαρών τοπικών αντιδράσεων.

Ο χρόνος παραμονής των ειδικών αντισωμάτων μετά τον εμβολιασμό δεν είναι γνωστός. Μελέτες, αναφέρουν ικανοποιητικούς τίτλους αντισωμάτων για τουλάχιστον 3-5 χρόνια μετά τον εμβολιασμό. Η ελάττωση των επεισοδίων της πνευμονιοκοκκικής μικροβιαιμίας, ανέρχεται σε 60-70% σε μελέτες που αφορούσαν ενήλικες. Σε παιδιά με δρεπανοκυτταρική αναιμία και άτομα με σπληνεκτομή ή άλλες παθολογικές καταστάσεις το εμβόλιο δεν φαίνεται να είναι λιγότερο αποτελεσματικό.

Το PPSV23 καλύπτει ευρύτερο φάσμα οροτύπων από ότι τα διαθέσιμα PCVs (Πίνακας 2) και θα μπορούσε θεωρητικά να αποτρέψει περισσότερα περιστατικά διεισδυτικής πνευμονιοκοκκικής νόσου (Pilishvili και συν., 2010), ωστόσο, το PPSV23 έχει ορισμένους περιορισμούς: 1). Είναι ελάχιστα ανοσογόνο στα παιδιά μικρότερα των 2 ετών (Robbins και συν., 1983, Song και συν., 2013, Andrews και συν., 2012), 2). Δεν έχει καλή αποτελεσματικότητα για την πρόληψη της πνευμονίας της κοινότητας και της διεισδυτικής νόσου σε άτομα με χρόνιες παθήσεις και σε άτομα 75 ετών ή μεγαλύτερα (Andrews και συν., 2012), 3). Δεν αποτρέπει τον αποικισμό στο ρινοφάρυγγα (Rosen και συν., 1984, Herva και συν., 1980, Douglas και συν., 1986) ή τις μη βακτηριακές λοιμώξεις του βλεννογόνου

πνευμονία και ΜΠΩ (Black και συν., 2008, O'Brien και Santosham, 2004) και 4). Οι συγκεντρώσεις αντισωμάτων μετά από επαναληπτικό εμβολιασμό με PPSV23 είναι χαμηλότερες από εκείνες που επιτυγχάνονται μετά τον αρχικό εμβολιασμό (Dagan και συν., 2010, O'Brien και συν., 2007). Το φαινόμενο αυτό της χαμηλής απάντησης σχετίζεται με την μεγάλη ποσότητα πολυσακχαριτών που περιέχει το PPSV23, η οποία εξαντλεί την μνήμη των Β-κυττάρων να ανταποκριθούν στον επανεμβολιασμό (Clutterbuck και συν., 2012).

8.2 Συζευγμένα εμβόλια (PCVs)

Βρέφη και μικρά παιδιά δεν ανταποκρίνονται επαρκώς στα πολυσακχαριδικά εμβόλια τα οποία περιέχουν αντιγόνα που δεν εξαρτώνται από τα Τ λεμφοκύτταρα, με αποτέλεσμα παραγωγή αντισωμάτων της υποομάδας IgG2 αντί IgG1 που παράγουν τα προϊόντα σύζευξης πρωτεΐνης-πολυσακχαρίτη, στα οποία τα παιδιά ανταποκρίνονται καλά. Τα αντισώματα της υποομάδας IgG1 βοηθούν την οψωνινοφαγοκυττάρωση του πνευμονιοκόκκου παρουσία συμπληρώματος και πρόληψη της λοίμωξης (Marchant και συν., 2005, de Roux και συν., 2008).

Η ανεπαρκής ανταπόκριση των παιδιών στα πολυσακχαριδικά εμβόλια οδήγησε στην ανάπτυξη των πνευμονιοκοκκικών συζευγμένων με πρωτεΐνη εμβολίων (PCVs), ειδικά για βρέφη και μικρά παιδιά. Τα συζευγμένα εμβόλια, αποτελούνται από πολυσακχαρίτες ομοιοπολικά συνδεδεμένους με πρωτεΐνη φορέα, η οποία προκαλεί αντισωματική απάντηση εξαρτώμενη από τα Τ-λεμφοκύτταρα και παραγωγή ειδικών G αντισωμάτων καθώς και Β-κύτταρα μνήμης. Η εξαρτώμενη από τα Τ-λεμφοκύτταρα ανοσολογική απάντηση προετοιμάζει τον οργανισμό ώστε μετά από έκθεση στο μικρόβιο να προστατεύεται με άμεση παραγωγή ειδικών αντισωμάτων, όπως συμβαίνει και με τον αναμνηστικό εμβολιασμό (booster vaccination) (Paradiso, 2012).

Τα εμβόλια του πνευμονιοκόκκου με τους αντίστοιχους οροτύπους που περιέχουν φαίνονται στο σχήμα 3 , ενώ τα χαρακτηριστικά τους συνοψίζονται στον πίνακα 6. Το PCV7 και το PCV13 έχουν την ίδια πρωτεΐνη και μέθοδο σύζευξης. Όλοι οι ορότυποι (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F και 23F) του PCV7 (Prevenar, Pfizer) και οι ορότυποι (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 5, 7F, 3, 6A, 19A) του PCV13 (Prevenar13, Pfizer) είναι συζευγμένοι με CRM_{197} (διφθεριτική πρωτεΐνη) μέσω αναγωγικής αμίνωσης, η οποία μπορεί να τροποποιήσει τον πολυσακχαρίτη ή να δημιουργήσει νέα επιτόπια (Poolman και συν., 2013). Η σύζευξη αυτή

που προκαλεί αλλαγές του επιτόπου μπορεί να εξηγήσει την μειωμένη ανοσογονικότητα του PCV7 για τον ορότυπο 19F και την απουσία διασταυρούμενης ανοσίας μεταξύ των οροτύπων 19F και 19A (Poolman και συν., 2011).

Το PCV10 (Synflorix, GlaxoSmithKline Biologicals), που περιλαμβάνει τους οροτύπους 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 5, 7F διαφέρει από το PCV7 και το PCV13 όσον αφορά τις πρωτεΐνες φορείς και μεθόδους σύζευξης. Στην περίπτωση του PCV10 κάθε ορότυπος είναι συζευγμένος με μία από τρεις πρωτεΐνες φορείς: ο ορότυπος 18C με τοξοειδές τετάνου (TT), ο ορότυπος 19F με τοξοειδές διφθερίτιδας (DT), και οι υπόλοιποι ορότυποι με πρωτεΐνη D μη τυποποιήσιμου στελέχους αιμόφιλου ινφλουέντζας (NTHi) (Poolman και συν., 2013).

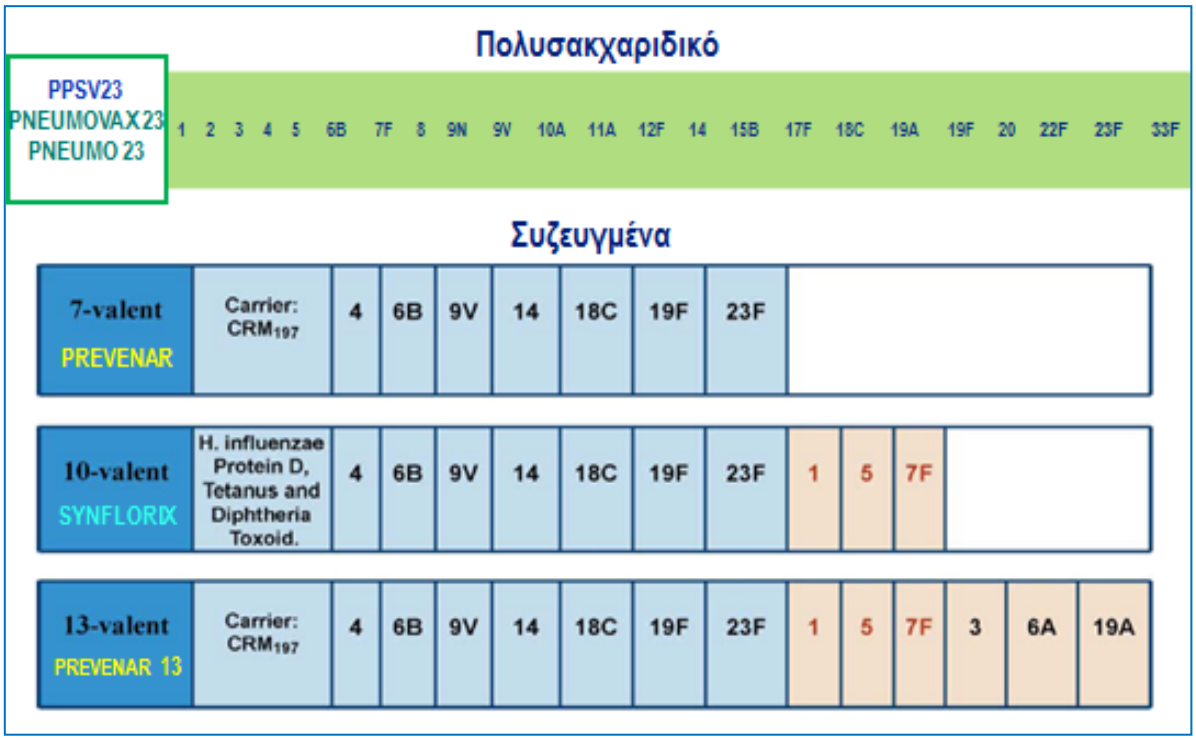
Το PCV7 περιλαμβάνει επτά οροτύπους, οι οποίοι απομονώνονταν συχνότερα από παιδιά κάτω των 5 ετών με διεισδυτική νόσο (Pilishvili και συν., 2010). Το PCV7 κυκλοφόρησε στις ΗΠΑ το 2000, ενώ στην Ευρώπη το 2001 και στην Ελλάδα το Δεκέμβριο του 2004. Στη χώρα μας άρχισε να χρησιμοποιείται μετά την ενσωμάτωσή του στο Εθνικό πρόγραμμα εμβολιασμών τον Ιανουάριο του 2006 και κυρίως μετά τον Ιούνιο του ιδίου έτους, λόγω αποζημίωσης του κατά 75%. Σημαντική, >90%, εμβολιαστική κάλυψη των παιδιών ≤ 5 ετών σημειώθηκε μετά την πλήρη αποζημίωση του εμβολίου, το 2008.

Ο εμβολιασμός με PCV7 συνιστάται για παιδιά 2 μηνών έως 5 ετών, με 4 δόσεις στις ηλικίες 2, 4, 6, και 12-18 μηνών. Στις περιπτώσεις που ο εμβολιασμός αρχίσει μετά τους 6 μήνες ζωής, χορηγούνται 3 δόσεις 7, 11 και 12-18 μηνών. Σε άτομα μεγαλύτερα του έτους που πρωτοεμβολιάζονται, δύο δόσεις με μεσοδιάστημα 2 μηνών και σε παιδιά ≥2 ετών μία δόση (Πίνακας 6).

Για την κάλυψη ευρύτερου φάσματος οροτύπων που προέκυψαν μετά την εισαγωγή του PCV7 (Prevenar), αναπτύχθηκαν τα εμβόλια PCV10 και PCV13. Το PCV10 κυκλοφόρησε στον Καναδά το 2008, με τρείς επιπλέον (1, 5, 7F) από το PCV7. Στη συνέχεια εγκρίθηκε από το Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων το 2009, ενώ δεν διατίθεται στις ΗΠΑ. Στην Ελλάδα το PCV10 διατίθεται από το 2009, αλλά συνταγογραφείται ελάχιστα, γιατί παράλληλα κυκλοφόρησε το PCV13 με επιπλέον τρείς οροτύπους (3, 6A, 19A), οι οποίοι ευθύνονται συχνά για τις ΔΠΝ στη χώρα μας. Το PCV13 εγκρίθηκε πρώτα στη Χιλή, το 2009, ενώ στις ΗΠΑ, την Ευρώπη και την Ελλάδα το 2010. Αρχικά, το PCV10 και το PCV13 εγκρίθηκαν για βρέφη και παιδιά για την προστασία από ΔΠΝ και ΜΠΩ (CDC 2010b) ενώ

το Δεκέμβριο του 2011, ο οργανισμός τροφίμων και φαρμάκων στις ΗΠΑ (Food and Drug Administration, FDA) ενέκρινε το PCV13 για ενήλικες ηλικίας ≥ 50 ετών (CDC, 2012).

Οι συστάσεις για χορήγηση των PCV10 και PCV13 στα παιδιά είναι ίδιες με του PCV7, ενώ για τους ενήλικες ≥ 50 ετών συνιστάται μία δόση του PCV13 (Πίνακας 6). (Nuorti και Whitney, 2010). Η Συμβουλευτική Επιτροπή για την Ανοσοποίηση (Advisory Committee on Immunization Practices, ACIP) των ΗΠΑ συνιστά τα ανοσοκατεσταλμένα άτομα ηλικίας ≥6 ετών να λαμβάνουν PCV13 ανεξάρτητα από τον εμβολιασμό με άλλα εμβόλια πνευμονιόκοκκου και ακολούθως PPSV23 τουλάχιστον 8 εβδομάδες αργότερα και 5 χρόνια από την προηγούμενη δόση του PPSV23 (CDC 2012, CDC 2013). Επίσης το ACIP συνιστά το PCV13 και το PPSV23 να χορηγούνται σε όλους τους ενήλικες ηλικίας ≥65 ετών, με 6 έως 12 μήνες μεσοδιάστημα (ελάχιστο 8 εβδομάδες) μεταξύ PCV13 και PPSV23 (Tomczyk και συν., 2014). Για να ελαχιστοποιηθεί η χαμηλή αντισωματική απάντηση, συνιστάται οι ενήλικες που έλαβαν πρώτα το PPSV23 να εμβολιάζονται με το PCV13 τουλάχιστον ένα έτος μετά την τελευταία δόση του PPSV23 (CDC 2012, Tomczyk και συν., 2014).



Σχήμα 3. Εμβόλια πνευμονιοκόκκου: πολυσακχαριδικό και συζευγμένα (ορότυποι και πρωτεΐνες σύζευξης).

Πίνακας 6. Κύρια χαρακτηριστικά εμβολίων πνευμονιοκόκκου που διατίθενται

Εμβόλιο / Εταιρεία	Πολυσακχαριδικό (PPVS23)			Συζευγμένα		
	Pneumovax23 / Merck	***Pneumo23*** / Sanofi Pasteur	***Pnu-Imune*** / Lederle	**PCV7** (***Prevenar*** / Pfizer)	**PCV10** (***Synflorix*** / GlaxoSmithKline)	**PCV13** (***Prevenar13*** / Pfizer)
Έτος Κυκλο-φορίας	1983			ΗΠΑ 2000 Ελλάδα 2004	Καναδάς 2008 Ελλάδα 2009	ΗΠΑ 2009 Ελλάδα 2010
Πρωτεΐνη φορέας (μg)	Καμία			CRM_{197} (διφθεριτική πρωτεΐνη)	NTHi πρωτεΐνη D TT (τοξοειδές τετάνου) DT (τοξοειδές διφθερίτιδας)	CRM_{197} (διφθεριτική πρωτεΐνη)
Ορότυποι	1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F και 33F			4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F και 23F	PCV7 + (1, 5, 7F)	PCV10 + (3, 6A, 19A)
Πολυσακ-χαρίτης (περιεκτι-κότητα)	25 μg /ορότυπο			6B 4 μg Υπόλοιποι 2 μg / ορότυπο	4, 18C, 19F, 3 μg / ορότυπο Υπόλοιποι 1 μg / ορότυπο	6B 4,4 μg Υπόλοιποι 2,2 μg / ορότυπο
Ανοσο-ενισχυτικό	Όχι			Φωσφορικό Αργίλιο 0,125 mg	Φωσφορικό Αργίλιο 0,125 mg	Φωσφορικό Αργίλιο 0,125 mg
Χορήγηση	>2 ετών Άτομα υψηλού κινδύνου (1 δόση, 0,5 mL επανάληψη άπαξ, μετά 5 χρόνια)			2, 4, 6 και 12-18 μηνών	2, 4, 6 και 12-18 μηνών	2, 4, 6 και 12-18 μηνών Παιδιά 2-59 μηνών που δεν έχουν εμβολισθεί Άτομα ηλικίας 5-18 ετών υψηλού κινδύνου Ενήλικες ≥ 65 ετών Ενήλικες ≥ 19 ετών με λειτουργική ή ανατομική ασπληνία, διαρροή ΕΝΥ ή κοχλιακά εμφυτεύματα

Γενικά τα συζευγμένα εμβόλια έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικά στην πρόληψη των ΔΠΝ και των μη διεισδυτικών λοιμώξεων (ωτίτιδα και παραρρινοκολπίτιδα) καθώς και του αποικισμού για τους οροτύπους που περιέχουν (εκτός για τον ορότυπο 3), όχι μόνο στον πληθυσμό που εμβολιάζεται αλλά και τον ανεμβολίαστο (συλλογική ανοσία-herd immunity), σε αντίθεση με PPSV23. Η συλλογική ανοσία που προκαλούν τα PCVs, οφείλεται στη μείωση του αποικισμού των εμβολιαζομένων και επομένως στη μείωση της μετάδοσης του πνευμονιοκόκκου σε μη εμβολιασμένα άτομα (CDC, 2005, Haber και συν 2007).

Το PCV7 ελάττωσε κατά 40% τις επισκέψεις στο γιατρό των παιδιών για ΜΠΩ και την συνταγογράφηση των αντιβιοτικών (Zhou, 2008). Είχε αποτελεσματικότητα κατά 57% στην πρόσληψη της ΜΠΩ για τους οροτύπους που περιέχει, σε μια φινλανδική τυχαιοποιημένη

κλινική μελέτη, ενώ η συνολική μείωση της ΜΠΩ από οποιονδήποτε ορότυπο του πνευμονιοκόκκου ήταν 34% (Eskola και συν., 2001). Οι ίδιοι συγγραφείς αναφέρουν αντικατάσταση οροτύπων και έλλειψη αποτελεσματικότητας σε επαναλαμβανόμενες ΜΠΩ (Jokinen και συν., 2012). Σημειώνεται επίσης ότι σημαντικό ποσοστό των ΜΠΩ είναι μεικτές λοιμώξεις που περιλαμβάνουν *S. pneumoniae* και μη-τυποποιήσιμο *Haemophilus influenzae* (NTHi) ως τα κύρια παθογόνα και πιθανόν η ευρεία χρήση του 10-δυνάμου εμβολίου, το οποίο είναι συζευγμένο με την πρωτεΐνη D του NTHi να επιτύχει περαιτέρω προστασία κατά της συλλοίμωξης (Palmu και συν., 2013).

Τα συζευγμένα εμβόλια έχουν αποδειχθεί ασφαλή και αποτελεσματικά, έναντι της ΔΠΝ σε διαφόρους πληθυσμούς (Black και συν., 2000, Whitney και συν., 2006). Το PCV7 έχει χρησιμοποιηθεί σε μεγάλο αριθμό μελετών στις αναπτυγμένες χώρες, οι οποίες έχουν τεκμηριώσει υψηλά ποσοστά αποτελεσματικότητας πάνω από 90% έναντι της ΔΠΝ, όπως η μελέτη των Black και συν. (Black και συν., 2002b, Miller και συν., 2011a). Επίσης, μια μεγάλη κλινική μελέτη, στη Βόρεια Καλιφόρνια (Kaiser Permanente), ανέφερε ποσοστό αποτελεσματικότητας 97,4% έναντι των ΔΠΝ από οροτύπους του εμβολίου (Black και συν., 2002b) και 89% για όλες τις ΔΠΝ, ανεξάρτητα από τον ορότυπο. Σύμφωνα με τον O'Brien και συν. (O'Brien και συν., 2003) σε ιθαγενείς της Αμερικής η αποτελεσματικότητα του PCV7 έναντι των τύπων του εμβολίου ήταν 77%. Το PCV7 δεν έχει δοκιμαστεί ευρέως σε χώρες χαμηλού και μεσαίου εισοδήματος. Κλινικές μελέτες έχουν γίνει στις χώρες αυτές με το PCV9, που περιλαμβάνει και τους οροτύπους 1 και 5 επιπλέον του PCV7, που δείχνουν μείωση της θνητότητας σε παιδιά της Γκάμπια (Cutts, 2005) και μείωση της πνευμονίας σε παιδιά με HIV λοίμωξη της Νότιας Αφρικής (Klugman και συν., 2003). Πρόσφατα στοιχεία από πολλές μελέτες τόσο στην Ευρώπη όσο και στις ΗΠΑ επιβεβαιώνουν ότι το PCV13 παρουσιάζει υψηλή αποτελεσματικότητα στην πρόληψη των ΔΠΝ, από 75% έως 90% (Andrews και συν., 2014, Miller και συν., 2011b, Simonsen και συν., 2014, Singleton και συν., 2013).

Σε αντίθεση με το PPSV23, τα PCVs έδειξαν επίσης σημαντική αποτελεσματικότητα στην πρόληψη της πνευμονίας. Το PCV7 έδειξε 27% μείωση της πνευμονίας των παιδιών (Lucero και συν., 2009) και το PCV13 ελάττωσε την πνευμονία της κοινότητας (Community-Acquired Pneumonia Immunization Trial in Adults, CAPiTA) κατά 45% σε ενήλικες ≥ 65 ετών (Bonten και συν., 2015).

8.3 Ανάπτυξη νέων εμβολίων

Τα συζευγμένα εμβόλια έναντι του πνευμονιοκόκκου (PCVs), που διατίθενται σήμερα, δεν καλύπτουν όλους τους οροτύπους. Η παρασκευή τους είναι πολύπλοκη και έχει υψηλό κόστος. Η προσπάθεια για τη βελτίωση τους επικεντρώνεται στην παρασκευή PCVs με περισσότερους οροτύπους, για ευρύτερη κάλυψη και στη βελτίωση της τεχνολογίας για τη μείωση του κόστους παρασκευής, ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν και στις αναπτυσσόμενες χώρες, όπου οι πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις αποτελούν μεγαλύτερο πρόβλημα από ότι στις ανεπτυγμένες. Παρόλα ταύτα, τα PCVs με περισσότερους οροτύπους, που ήδη είναι έτοιμα να κυκλοφορήσουν δεν θα λύσουν το πρόβλημα της νόσου. Έτσι, η ανάπτυξη εμβολίου από πρωτεΐνες που είναι κοινές σε όλα τα στελέχη, θα μπορούσε να παρέχει ευρεία προστασία για τα παιδιά σε όλο τον κόσμο.

Οι εξελίξεις στον τομέα της βιοτεχνολογίας παρέχουν ευκαιρίες για την ανάπτυξη, παραγωγή και διάθεση νέας γενιάς εμβολίων. Μία τέτοια προσέγγιση είναι ο στόχος των ερευνητών για την ανάπτυξη εμβολίου έναντι του πνευμονιοκόκκου από αντιγόνα κοινά σε όλα τα στελέχη, που θα προλαμβάνει τη νόσο ανεξάρτητα από τον ορότυπο που την προκαλεί. Υποψήφια αντιγόνα για την παρασκευή τέτοιου εμβολίου περιλαμβάνουν πολλές πρωτεΐνες του μικροβίου, όπως η πνευμονιολυσίνη, η αυτολυσίνη, η νευραμινιδάση, η πνευμονιοκοκκική επιφανειακή πρωτεΐνη A (PspA), η πνευμονιοκοκκική επιφανειακή πρωτεΐνη C (PspC), πνευμονιοκοκκικό επιφανειακό αντιγόνο A (PsaA ή πρωτεΐνη 37-kDa) και πιθανότατα και άλλες (Alderson 2016, Butler και συν., 1999, Ogunniyi και Paton, 2015). Αυτές οι πρωτεΐνες μόνες ή σε συνδυασμό θα μπορούσε όχι μόνο να παρέχουν προστασία έναντι όλων των οροτύπων, αλλά επίσης ανοσολογική απάντηση εξαρτώμενη από τα Τ-κύτταρα και ανοσολογική μνήμη. Προκλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα εμβόλια με βάση κοινές πρωτεΐνες πνευμονιόκοκκου μπορούν να προστατεύσουν πειραματόζωα (ποντίκια) από αποικισμό, πνευμονία, και ΔΠΝ μετά από μόλυνση με *S. pneumoniae*. Πρωτεϊνικά εμβόλια και ολοκυτταρικά έχουν προχωρήσει σε κλινικές μελέτες φάση 1 και 2 σε παιδιά, αλλά αντιμετωπίζουν πολλά προβλήματα για να μπορέσουν να πάρουν άδεια κυκλοφορίας για να γίνουν ευρέως αποδεκτά. Θα απαιτηθούν μελέτες αποτελεσματικότητας για τις ΔΠΝ και την ωτίτιδα πριν από τη διαθεσιμότητα των εμβολίων αυτών.

Μία άλλη καινοτόμος προσέγγιση είναι η παρασκευή εμβολίων με ανασυνδυασμό DNA που μπορεί να κατασκευαστεί πιο εύκολα και να είναι σταθερό. Τα αποτελέσματα των

προκαταρκτικών εργασιών που αφορούν ανασυδυασμένες πρωτεΐνες επιτόπων, κοινές σε όλα τα στελέχη πνευμονιοκόκκου, είναι ενθαρρυντικά.

Σημαντικές πρόοδοι έχουν επιτευχθεί τα τελευταία 3-5 χρόνια, με την χρήση των PCV10 και PCV13 και κυρίως με την πρόσφατη εισαγωγή τους στις αναπτυσσόμενες χώρες, στην πρόληψη των πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων. Η προσπάθεια από τις παρασκευάστριες εταιρείες σε χώρες χαμηλού και μεσαίου εισοδήματος για την παρασκευή και την άδεια κυκλοφορίας PCVs με περισσότερους οροτύπους και με χαμηλότερο κόστος θα βοηθήσει περεταίρω στον περιορισμό των πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων. Η ανάπτυξη νέων εμβολίων από υποομάδες πρωτεΐνης έχει προχωρήσει σημαντικά, έτσι ώστε πολλές να βρίσκονται σε κλινικές δοκιμές φάσης 2 με καλά αποτελέσματα όσον αφορά στον αποικισμό. Πολλές εταιρείες, συμπεριλαμβανομένων των Pfizer, GSK, Sanofi Pasteur και Genocea, συμμετέχουν στην παρασκευή και στις κλινικές δοκιμές των εμβολίων από υπο-ομάδες πρωτεΐνης.

ΙΙ. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ο *Streptococcus pneumoniae* ή πνευμονιόκοκκος αποτελεί σημαντικό παθογόνο για τον άνθρωπο, παρά την ανακάλυψη και ευρεία χρήση των αντιβιοτικών τα τελευταία 70 χρόνια και των πνευμονιοκοκκικών εμβολίων, αρχικά των πολυσακχαριδικών και ακολούθως των συζευγμένων για περισσότερα από 30 και 15 χρόνια αντίστοιχα. Είναι υπεύθυνος για τουλάχιστον το ήμισυ του συνόλου των περιπτώσεων της εξωνοσοκομειακής πνευμονίας και μέσης ωτίτιδας και παραμένει σημαντική αιτία διεισδυτικής πνευμονιοκοκκικής νόσου (βακτηριαιμίας και μηνιγγίτιδας) (WHO 2007, O'Brien και συν., 2009, WHO 2012a, 2012b).

Όπως εκτιμάται, το 2000 αναφέρθηκαν παγκοσμίως περίπου 14,5 εκατομμύρια (11,1-18,0 εκατομμύρια) επεισόδια σοβαρής πνευμονιοκοκκικής νόσου και περίπου 826.000 θάνατοι (582.000-926.000) σε παιδιά ηλικίας 1 έως 59 μηνών (O'Brien και συν., 2009). Επίσης ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (Word Health Organization , WHO), το 2005, ανέφερε ότι η πνευμονιοκοκκική νόσος ευθύνονταν για τουλάχιστον 1,6 εκατομμύρια θανάτους ετησίως (WHO 2007), από τους οποίους οι 700.000 έως 1.000.000 αφορούσαν παιδιά ηλικίας <5 ετών, τα περισσότερα από τα οποία ζούσαν σε αναπτυσσόμενες χώρες. Μετά δε από το 2009 οι θάνατοι από πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις υπολογίζονται σε >500.000 ετησίως σε παιδιά κάτω των πέντε ετών και αντιπροσωπεύουν το 5,4 έως 11% όλων των θανάτων για τον πληθυσμό αυτό (Murray και συν., 2014, O'Brien και συν., 2009, WHO 2015, Walker και συν., 2013).

Ο μεγάλος αριθμός των οροτύπων του μικροβίου που δεν επιτρέπει την παρασκευή εμβολίου έναντι όλων των οροτύπων, η ανάδυση νέων παθογόνων οροτύπων μετά την εφαρμογή των συζευγμένων εμβολίων (PCVs), η ανάπτυξη πολυανθεκτικών στα αντιβιοτικά στελεχών που καθιστά δύσκολη την αντιμετώπιση των λοιμώξεων αυτών συντελούν ώστε οι διεισδυτικές και μη διεισδυτικές πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις να συνεχίζουν να προβληματίζουν και να αποτελούν αντικείμενο έρευνας σε παγκόσμιο επίπεδο. Η δραματική αλλαγή της επιδημιολογίας της πνευμονιοκοκκικής νόσου μετά την εφαρμογή των συζευγμένων εμβολίων, είχε ως αποτέλεσμα να μειωθούν σημαντικά οι διεισδυτικές και μη λοιμώξεις από οροτύπους που περιλαμβάνονται στα εμβόλια αυτά και σήμερα η νόσος να προκαλείται κατά κύριο λόγο από άλλους οροτύπους, εκτός PCVs (Bocchini και συν., 2010, Yildirim και συν., 2012). Οι νέοι ορότυποι έχουν συσχετισθεί με αλλαγές στις κλινικές εκδηλώσεις της νόσου, στην επίπτωσή της στις διάφορες ηλικιακές ομάδες, καθώς και με την

αντοχή των στελεχών στα αντιβιοτικά που προκαλούν διεισδυτικές πνευμονιοκοκκικές νόσους (ΔΠΝ) και άλλες λοιμώξεις. Η ευεργετική επίδραση της αποτελεσματικότητας των PCVs ήταν εμφανής τόσο στις ΔΠΝ όσο και στη μέση πυώδη ωτίτιδα (ΜΠΩ).

Σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν να μελετηθεί διαχρονικά, 1986-2015, η εξέλιξη της πνευμονιοκοκκικής νόσου στα παιδιά πριν από και μετά την εφαρμογή των PCVs. Συγκεκριμένα, να μελετηθούν η επίπτωση και επιδημιολογία της νόσου, οι διακυμάνσεις των υπεύθυνων οροτύπων που προκαλούν διεισδυτικές και μη λοιμώξεις, η εξέλιξη της αντοχής των στελεχών στις κύριες ομάδες των αντιβιοτικών και οι μηχανισμοί αντοχής στα β-λακταμικά αντιβιοτικά και τις μακρολίδες. Επιπλέον να γίνει συσχέτιση της αντοχής με τους οροτύπους καθώς και γενετικός χαρακτηρισμός επιλεγμένων (19A) στελεχών με τη μέθοδο του πολυτοπικού προσδιορισμού αλληλούχισης. Η αποτύπωση των παραμέτρων αυτών είναι απαραίτητη στη χώρα μας, όπως και σε κάθε περιοχή παγκοσμίως, για την χάραξη πολιτικής όσον αφορά στην αντιμετώπιση (επιλογή εμπειρικής αντιμικροβιακής αγωγής) και πρόληψη της πνευμονιοκοκκικής νόσου (καταλληλότητα εφαρμογής των κυκλοφορούντων PCVs και επιλογή συχνότερων οροτύπων για το σχεδιασμό παρασκευής νέων εμβολίων).

2. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Πληθυσμός της μελέτης

Στη μελέτη συμπεριελήφθησαν παιδιά ενός μηνός μέχρι 14 ετών με πνευμονιοκοκκική λοίμωξη επιβεβαιωμένη με καλλιέργεια, τα οποία νοσηλεύτηκαν ή εξετάσθηκαν στα εξωτερικά ιατρεία του νοσοκομείου Παίδων «Η Αγία Σοφία» σε τρείς χρονικές περιόδους: 1) 1986-2005 πριν την εφαρμογή των συζευγμένων εμβολίων, 2) 2006-2010 μετά την εφαρμογή του PCV7 και 3) 2011-2015 μετά την εφαρμογή των PCV10 και PCV13. Κατά την πρώτη περίοδο συλλέχθηκαν δημογραφικά και κλινικά δεδομένα από τους ιατρικούς φακέλους των ασθενών αναδρομικά, ενώ στις επόμενες δύο προοπτικά.

Από τους ασθενείς αυτούς βάσει προτυποποιημένου δελτίου καταγραφής συγκεντρώθηκαν τα ακόλουθα δημογραφικά στοιχεία: φύλο, ηλικία, ημερομηνία έναρξης της νόσου και λήψη της καλλιέργειας, βιολογικό υλικό απομόνωσης του μικροβίου, εστία της λοίμωξης και ιστορικό εμβολιασμού των ασθενών με πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο (είδος εμβολίου, αριθμός δόσεων και ημερομηνία εμβολιασμού). Ασθενείς με ΔΠΝ χαρακτηρίστηκαν οι περιπτώσεις από τις οποίες απομονώθηκε *S. pneumoniae* από φυσιολογικά στείρα περιοχή (π.χ. αίμα, εγκεφαλονωτιαίο υγρό, πλευριτικό υγρό, αρθριτικό υγρό ή άλλη στείρα περιοχή) και ως μη διεισδυτικές αυτές από τις οποίες απομονώθηκε *S. pneumoniae* από μη στείρα περιοχή (μέσο ους).

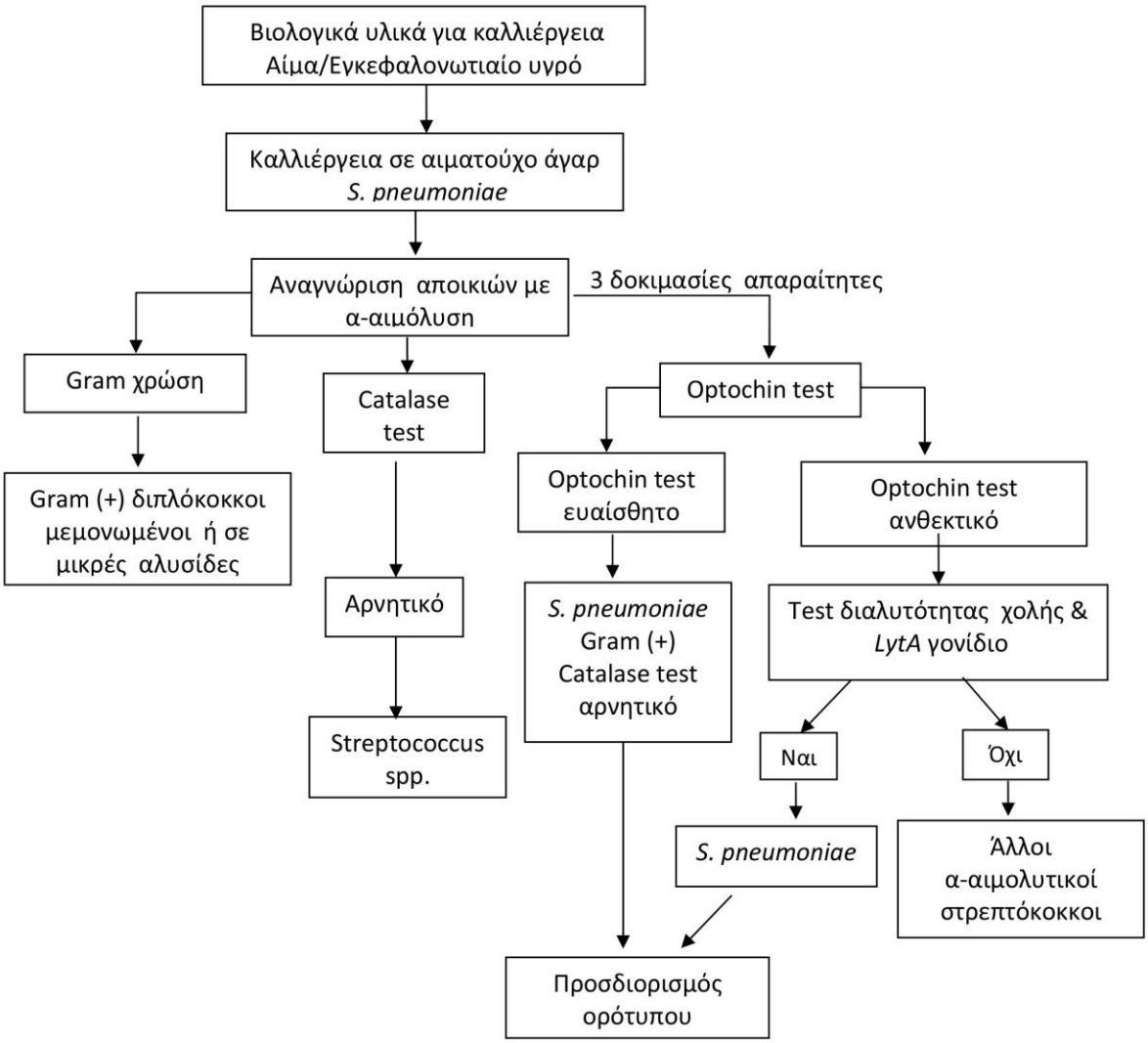
2.2 Μικροβιακά στελέχη πνευμονιοκόκκου

Από τον Ιανουάριο του 1986 έως το Δεκέμβριο του 2015 όλα τα στελέχη του πνευμονιοκόκκου που απομονώνονταν από αίμα, εγκεφαλονωτιαίο υγρό, πλευριτικό υγρό, αρθριτικό υγρό ή άλλη στείρα περιοχή του σώματος και από το μέσο ους συλλέγονταν από το Τμήμα Λοιμώξεων και Χημειοθεραπείας και φυλάσσονταν στους -80°C. Για την καλλιέργεια των στελεχών χρησιμοποιήθηκε Columbia agar εμπλουτισμένο με 5% αίμα προβάτου (bioMérieux SA), και η επώαση έγινε στους 35 ± 2°C σε ατμόσφαιρα 5% CO2 για 18 έως 24 ώρες.

2.3 Ταυτοποίηση στελεχών πνευμονιοκόκκου

Για την ταυτοποίηση των στελεχών χρησιμοποιήθηκαν οι κλασικές τεχνικές που αφορούν στη μορφολογία των αποικιών του μικροβίου σε αιματούχο άγαρ, την ευαισθησία τους στην

αιθυλική υδροκουπρεΐνη (οπτοχίνη), τη μορφολογία στη Gram χρώση, τη δοκιμασία της καταλάσης και τη διαλυτότητα στα χολικά άλατα (Σχήμα 4). Τα στελέχη που ήταν ανθεκτικά στη οπτοχίνη εξετάσθηκαν με την μέθοδο PCR για την ανίχνευση του γονιδίου *lytA* που κωδικοποιεί την αυτολυσίνη του πνευμονιοκόκκου και ανευρίσκεται σε όλα τα στελέχη. Για την ανίχνευση του γονιδίου *lytA* χρησιμοποιήθηκαν οι συνθήκες και οι εκκινητές, όπως περιγράφονται από τον Nagai και συν. (Nagai και συν., 2001) και αναφέρονται κατωτέρω.



Σχήμα 4. Αλγόριθμος ταυτοποίησης πνευμονιοκόκκου (*S. pneumoniae*).

2.4 Οροτυπία στελεχών πνευμονιοκόκκου

Η τυποποίηση των στελεχών σε οροτύπους έγινε με τις μεθόδους Latex (Pneumotest-Latex) και την εξοίδηση του ελύτρου (Neufeld ή Quellung reaction) σε μικροσκόπιο αντιθέτου φάσεως, με ειδικούς αντιορούς, η προμήθεια των οποίων έγινε από το Statens

Serum Institut (Copenhagen, Denmark). Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε με την ακόλουθη σειρά. Πρώτα το στέλεχος εξετάστηκε με Pneumotest-Latex για να καθοριστεί ο ορότυπος ή οροομάδα με ανάμειξη περίπου 10μL αντιδραστηρίου από κάθε δεξαμενή (Pool A έως I και P έως T) με αντίστοιχη ποσότητα εναιωρήματος του υπό εξέταση στελέχους σε NaCl 0,9%, από φρέσκη καλλιέργεια σε αιματούχο άγαρ. Θετική ήταν η αντίδραση που εμφάνισε συγκόλληση εντός 5 έως 10 δευτερολέπτων. Ο καθορισμός του οροτύπου ή οροομάδας έγινε με τη βοήθεια του (πίνακα 7), ανάλογα με τη σύμπτωση των θετικών αποτελεσμάτων στις οριζόντιες και κάθετες δεξαμενές.

Τα στελέχη που ταξινομήθηκαν σε οροομάδες, προσδιορίστηκε ο ορότυπος τους με τη δοκιμασία εξοίδησης του ελύτρου (Neufeld ή αντίδραση Quellung) με τους αντίστοιχους αντιορούς της οροομάδας που ανήκε το στέλεχος. Περίπου 2-4 μL εναιωρήματος πνευμονιόκοκκου αναμιγνύεται με ίση ποσότητα αντιορού, τοποθετείται καλυπτρίδα πάνω από την υγρή ανάμιξη, ακολούθως κεδρέλαιο και μικροσκόπηση με μεγεθυντικό φακό X100 σε μικροσκόπιο αντιθέτου φάσεως. Στον αντίστοιχο αντιορό που παρατηρείται εξοίδηση του ελύτρου (κάψας) και συγκόλληση των μικροβίων καθορίζεται και ο ορότυπος. Στον πίνακα 7 φαίνονται οι αντιοροί που χρησιμοποιήθηκαν και αφορούσαν στον έλεγχο σε 91 οροτύπους από τους ≥ 93 γνωστούς μέχρι σήμερα.

Πίνακας 7. Αναγνώριση στελεχών πνευμονιοκόκκου σε οροομάδες και οροτύπους*

Pool	P	Q	R	S	T	Non-vaccine groups/types
A	**1**	**18** (18F, 18A, 18B, **18C**)	**4**	**5**	**2**	
B	**19** (**19F**, **19A**, 19B, 19C)	**6** (6A, **6B**, 6C)	**3**	**8**		
C	**7** (**7F**, 7A, 7B, 7C)				**20**	24 (24F, 24A, 24B) 31, 40
D			**9** (9A, 9L, **9N**, **9V**)		**11** (11F, **11A**, 11B, 11C, 11D)	16 (16F, 16A) 36, 37
E			**12** (**12F**, 12A, 12B)	**10** (10F, **10A**, 10B, 10C)	**33** (**33F**, 33A, 33B, 33C, 33D)	21, 39
F				**17** (**17F**, 17A)	**22** (**22F**, 22A)	27 32 (32F, 32A) 41 (41F, 41A)
G						29, 34 35 (35F, 35A, 35B, 35C) 42 47 (47F, 47A)
H	**14**	**23** (**23F**, 23A, 23B)		**15** (15F, 15A, **15B**, 15C)		13 28 (28F, 28A)
I						25 (25F, 25A) 38, 43, 44, 45, 46, 48

**Αντιοροί που περιλαμβάνονται στο Pneumotest Kit για τη δοκιμασία Latex.*

2.5 Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά

Ο έλεγχος της ευαισθησίας στα αντιβιοτικά έγινε με την μέθοδο των δίσκων (Kirby-Bauer) και με προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) με Etest (bioMérieux SA). Προσδιορίστηκε η ευαισθησία στα β-λακταμικά αντιβιοτικά (penicillin, cefotaxime), στις μακρολίδες (erythromycin), λινκοσαμίδες (clindamycin), γλυκοπεπτίδια (vancomycin), ριφαμπικίνη (rifampicin), chloramphenicol, tetracycline, κινολόνες (moxifloxacin), trimethoprim-sulfamethoxazole και οξαζολιδινόνες (linezolid).

Χρησιμοποιήθηκε και για τις δύο δοκιμασίες Mueller-Hinton άγαρ εμπλουτισμένο με 5% αίμα προβάτου (bioMérieux SA), στο οποίο εμβολιάστηκε εναιώρημα του υπό εξέταση στελέχους, θολερότητας 0,5 (ή 1 για βλεννώδη στελέχη) της κλίμακας McFarland. Το εναιώρημα κάθε μικροβίου παρασκευάζονταν από φρέσκη καλλιέργεια σε Columbia agar εμπλουτισμένο με 5% αίμα προβάτου (bioMérieux SA), που είχε επωασθεί τουλάχιστον για 18 ώρες. Από την καλλιέργεια λαμβάνονταν μεμονωμένες αποικίες και αραιώνονταν σε θρεπτικό ζωμό ή απεσταγμένο νερό για να επιτευχθεί η καθορισμένη θολερότητα. Ο εμβολιασμός του τρυβλίου γινόταν με βαμβακοφόρο στυλεό, ο οποίος εμβαπτιζόταν στο εναιώρημα, στη συνέχεια περιστρεφόταν με μέτρια πίεση στο εσωτερικό τοίχωμα του δοκιμαστικού σωλήνα να απομακρυνθεί η περίσσεια του υγρού και επιστρωνόταν προσεκτικά σε ολόκληρη την επιφάνεια του άγαρ τρεις φορές, περιστρέφοντας το τρυβλίο 60 μοίρες κάθε φορά για να επιστρωθεί ομοιόμορφα. Μετά από αναμονή περίπου 15-20 λεπτά για να απορροφηθεί η υπερβολική υγρασία, έτσι ώστε η επιφάνεια να είναι εντελώς στεγνή πριν την εφαρμογή των δίσκων ή των ταινιών του Etest. Ακολουθούσε επώαση για 18 έως 24 ώρες στους 35 ± 2°C σε ατμόσφαιρα 5% CO2. Τα αποτελέσματα της διαμέτρου των δίσκων (σε mm) και οι τιμές του Etest (σημείο που αρχίζει η αναστολή ανάπτυξης του μικροβίου σε μg/mL) αξιολογήθηκαν σύμφωνα με τα κριτήρια του CLSI 2014 για να χαρακτηριστούν τα στελέχη ευαίσθητα, με ενδιάμεση αντοχή ή ανθεκτικά.

Για την ευαισθησία του πνευμονιοκόκκου στην πενικιλλίνη με Kirby-Bauer χρησιμοποιήθηκε δίσκος οξακιλλίνης 1 μg και ευαίσθητα χαρακτηρίστηκαν τα στελέχη με διάμετρο αναστολής ≥20 mm. Επίσης όλα τα στελέχη ανεξάρτητα πηγής απομόνωσης χαρακτηρίζονταν ως ευαίσθητα, με ενδιάμεση αντοχή, ή ανθεκτικά αν οι MIC ήταν ≤0.06 μg/mL, 0,12-1,0 μg/mL ή ≥ 2 μg/mL για την πενικιλλίνη και ≤ 0,5 μg/mL, 1,0 μg/mL ή ≥ 2 μg/mL για την κεφοταξίμη αντίστοιχα. Ο φαινότυπος αντοχής στις μακρολίδες έγινε με τη

μέθοδο διάχυσης διπλού δίσκου (D-test) με τη χρήση τυποποιημένων δίσκων ερυθρομυκίνης 15 μg και κλινδαμυκίνη 2 μg (Oxoid Company, Μεγάλη Βρετανία) (CLSI 2014).

2.6 Μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης γονιδίων αντοχής

Τα ανθεκτικά στην πενικιλλίνη και στις μακρολίδες στελέχη εξετάσθηκαν για την παρουσία γονιδίων αντοχής με τη μέθοδο PCR. Η μεταβολή στην αλληλουχία των πενικιλλοδεσμευτικών πρωτεϊνών (PBPs) έγινε με ενίσχυση συγκεκριμένων περιοχών των γονιδίων *pbp1a, pbp2b* και *pbp2x* όπως περιγράφεται από τους Fukushima και συν. το 2008, ενώ η ανίχνευση των γονιδίων αντοχής στις μακρολίδες, *erm*(B), *mef*(E) και *mef*(A), εξετάσθηκε με PCR χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές όπως περιγράφεται από τους Bley και συν., το 2011. Η διάκριση μεταξύ *mef*(A) και *mef*(E) γονιδίων έγινε με πολλαπλή "multiplex" PCR όπως περιγράφεται από τους ίδιους συγγραφείς. Σε όλα τα πειράματα PCR συμπεριλήφθηκαν θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες.

Για την ανίχνευση των γονιδίων αντοχής στην πενικιλλίνη ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν στελέχη με χαμηλή και υψηλή αντοχή στην πενικιλλίνη και ως αρνητικός μάρτυρας ευαίσθητο στέλεχος στην πενικιλλίνη MIC = 0,003 μg/mL, ενώ για την ανίχνευση γονιδίων αντοχής στις μακρολίδες ως θετικοί μάρτυρες αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη αναφοράς GA40555 και GA1929, που έφεραν τα γονίδια *erm*(B) και *mef* αντίστοιχα και ως αρνητικός μάρτυρας το ευαίσθητο στις μακρολίδες στέλεχος GA16328. Τα στελέχη αυτά προσφέρθηκαν ευγενικά από το εργαστήριο του Dr. David Stephens, από το Emory University School of Medicine, Atlanta, Georgia.

Τα στελέχη καλλιεργήθηκαν σε αιματούχο άγαρ (Columbia agar) εμπλουτισμένο με 5% αίμα προβάτου (bioMérieux SA). Έγινε εκχύλιση του γονιδιακού DNA από μεμονωμένες αποικίες χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο του Κέντρου Ελέγχου Λοιμώξεων των ΗΠΑ (http://www.cdc.gov/streplab/protocol-emm-type.htmL).

2.7 Χαρακτηρισμός στελεχών με τη μέθοδο του πολυτοπικού προσδιορισμού αλληλουχίας (*Multilocus Sequence Typing, MLST*)

Σε 31 στελέχη οροτύπου 19A που επιλέχθηκαν τυχαία διαχρονικά έγινε πολλαπλασιασμός του DNA για 7 διατηρημένα γονίδια (*aroE, gdh, gki, recP, ddl, spe* και *xpt*) όπως περιγράφεται από τους Enright και Spratt (Enright και Spratt, 1998) και τα προϊόντα PCR υποβλήθηκαν σε πολυτοπικό προσδιορισμό αλληλουχίας με το ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer. Η επεξεργασία και ομοπαράθεση των αλληλουχιών έγινε με το πρόγραμμα BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.1.9 (http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit /bioedit.htmL). Οι αλληλουχίες των βάσεων επελέγησαν από την ιστοσελίδα www.mlst.net και έγινε σύγκριση με τις αλληλουχίες των αντίστοιχων αλληλόμορφων, όπως περιγράφονται στη βάση δεδομένων του MLST (http:.//spneumoniae.mLst.net/) προκειμένου να προσδιοριστεί ο τύπος αλληλουχίας (Sequence Type, ST). Το κλωνικό σύμπλεγμα προσδιορίστηκε με τη χρήση του αλγόριθμου eBURST από την ίδια ιστοσελίδα.

2.8 Ερευνητικά πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν για τις μοριακές τεχνικές

2.8.1 Πρωτόκολλο εκχύλισης DNA

Για την εκχύλιση του DNA από τα στελέχη του πνευμονιοκόκκου χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο του CDC, των ΗΠΑ όπως περιγράφεται για το Στρεπτόκοκκο, http://www.cdc.gov/streplab/protocol-emm-type.html)

1. Με αποστειρωμένο κρικοφόρο στυλεό 10μL μεταφέρονται αποικίες από φρέσκη καλλιέργεια του υπό εξέταση μικροβίου σε 300 μL, 0,9% NaCl, σε κωνικά πλαστικά σωληνάρια 1,5 mL (Eppendorf) και παρασκευάζεται εναιώρημα (θολερότητας περίπου 1 της κλίμακας McFarland).
2. Το εναιώρημα επωάζεται στους 70° C για 15 λεπτά (Heat Block).
3. Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρούνται σε 10.000 στροφές (rpm) για 2 λεπτά σε μικροφυγόκεντρο και με πιπέττα απορρίπτεται το υπερκείμενο υγρό.
4. Στο ίζημα προστίθενται 50 μL TE ρυθμιστικό διάλυμα (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8), 10 uL μουτανολυσίνης 3000 μονάδες/mL, (Sigma M9901, 4000 U/mg protein) και 2 μL υαλουρονιδάση 30 mg / mL, (Sigma H-3506, 300-750 /mg).
5. Έγινε καλή ανάμειξη (Vortex) και ακολουθεί επώαση στους 37° C (σε κλίβανο ή υδατόλουτρο) για 1 ώρα και 30 λεπτά (ελάχιστο διάστημα 30 λεπτά).

6. Ακολουθεί επώαση στους 100°C (Heat Block) για 10 λεπτά προκειμένου να αδρανοποιηθούν τα ένζυμα.
7. Έγινε φυγοκέντρηση των δειγμάτων σε 10.000 στροφές για 4 λεπτά.
8. Ακολουθεί άμεσα PCR ή μεταφέρουμε το εκχύλισμα DNA σε καθαρά σωληνάρια και αποθηκεύουμε στους -20°C μέχρι τη χρήση.

2.8.2 Ανίχνευση γονιδίου lytA με PCR

Χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι εκκινητές

Αλληλουχία εκκινητών (Nagai *et al.* 2001)	Μέγεθος προϊόντος
lytA-F 5'-$_{681}$ CAA CCG TAC AGA ATG AAG CGG$_{701}$-3	319bp
lytA-R 5'-$_{999}$ TTA TTC GTG CAA TAC TCG TGC G$_{978}$-3'	

— Οι εκκινητές αρχικά αραιώνονται σε stock στα 100 pmol/μL (100μM) και έπειτα
— 7,5 μL+42,5 μL dH2O για συγκέντρωση 15 μM

1. Μείγμα PCR ανά δείγμα (1x mix)

5X Standard Buffer (NEB)	5,0 μL
25mM $MgCl_2$	0,25 μL
10mM dNTPs	1,0 μL
1.5U/μL Taq Pol (NEB M0273S)	0,25 μL
15 pmoles/ μL primer lytA-F	1,0 μL
15 pmoles/ μL primer lytA-R	1,0 μL
RNase-free H_2O	16,5 μL
Ολικός όγκος για κάθε δείγμα	25,0 μL

2. Προσθήκη 24 μL από το PCR μείγμα και 1 μL DNA σε κάθε σωληνάριο.
3. Σύντομη περιστροφική κίνηση (spin) σε μικροφυγόκεντρο για 5 δευτερόλεπτα.
4. Πολλαπλασιασμός DNA σε θερμοκυκλοποιητή με το παρακάτω πρόγραμμα:

Συνθήκες πολλαπλασιασμού του DNA στον θερμοκυκλοποιητή			
Στάδια	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη (Initial Denaturation)	94°C	5 λεπτά	X1
Αποδιάταξη (Denaturation)	94oC	30 δευτερόλεπτα	
Πρόσδεση εκκινητών (Annealing)	53°C	1 λεπτό	X30
Επέκταση (Extension)	68°C	1 λεπτό	
Τελική επέκταση (Final extension)	68°C	5 λεπτά	X1
Διακοπή (Pause)	4°C	Παραμονή (Hold)	

5. Η ανίχνευση των PCR προϊόντων έγινε με ηλεκτροφόρησή τους σε πήκτωμα (gel) αγαρόζης-TBE 1.2% με βρωμιούχο αιθίδιο (10 mg/mL) 6 μL σε 100 mL gel αγαρόζης στα 100V για περίπου 1,5 ώρα (φόρτωση 5μL DNA+1μL loading buffer 6X Orange Dye συνοδεύει το DNA ladder 50bp της Promega). Χρησιμοποιήθηκε κλίμακα διαβάθμισης του μεγέθους του DNA 1 Kb Plus DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific (Ref. 10787018). Η οπτικοποίηση και φωτογράφηση των αποτελεσμάτων έγινε σε UV λάμπα.

2.8.3 Ανίχνευση πενικιλλινοδεσμευτικών πρωτεϊνών (γονιδίων pbp1a, pbp2b, pbp2x με PCR)

Χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι εκκινητές

Αλληλουχία εκκινητών (Fukushima *et al.* 2008)	Μέγεθος προϊόντος
pbp1a-F 5'-$_{1709}$AGT ATA TCA AGA ACA CTG GCT ACG$_{1732}$-3'	370bp
pbp1a-R 5'-$_{2061}$GCT TGG AGT GGT TGA GCT A$_{2079}$-3'	
pbp2b-F 5'-$_{1291}$AAA TTG GCA TAT GGA TCT TTT$_{1312}$-3'	460bp
pbp2b-R 5'-$_{1732}$TAT TCA TCT CTG TCG GTT GC$_{1751}$-3'	
pbp2x-F 5'-$_{990}$AAG TAA CTA TGA ACC AGG ATC AG$_{1012}$-3'	417bp
pbp2x-R 5'-$_{1388}$CGA AGC ATT TGT GTT TGT GT$_{1407}$-3'	

— Οι εκκινητές αρχικά αραιώνονται σε stock 100 pmol/μL (100μM) και έπειτα
— 1.5 μL+42.5 μL dH2O για συγκέντρωση 15 μM

1. Μείγμα PCR ανά δείγμα (1x mix)

5X Standard Buffer (NEB)	5,0 μL
25 mM $MgCl_2$	0,25 μL
10 mM dNTPs	1,0 μL
1.5 U/μL Taq Pol (NEB M0273S)	0,25 μL
15 pmoles/ μL primer Pbp1a-F	1,0 μL
15 pmoles/ μL primer Pbp1a -R	1,0 μL
15 pmoles/ μL primer Pbp2b-F	1,0 μL
15 pmoles/ μL primer Pbp2b -R	1,0 μL
15 pmoles/ μL primer Pbp2x-F	1,0 μL
15 pmoles/ μL primer Pbp2x -R	1,0 μL
RNase-free H_2O	12,5 μL
Ολικός όγκος για κάθε δείγμα	25,0 μL

2.Προσθήκη 24 μL από το PCR μείγμα και 1 μL DNA σε κάθε σωληνάριο.

3. Σύντομη περιστροφική κίνηση (spin) σε μικροφυγόκεντρο για 5 δευτερόλεπτα.

4.Πολλαπλασιασμός DNA σε θερμοκυκλοποιητή με το παρακάτω πρόγραμμα:

Συνθήκες πολλαπλασιασμού του DNA στον θερμοκυκλοποιητή			
Στάδια	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη (Initial Denaturation)	95°C	30 δευτερόλεπτα	X1
Αποδιάταξη (Denaturation)	95oC	30 δευτερόλεπτα	
Πρόσδεση εκκινητών (Annealing)	60°C	1 λεπτό	X30
Επέκταση (Extension)	68°C	1 λεπτό	
Τελική επέκταση (Final extension)	68°C	5 λεπτά	X1
Διακοπή (Pause)	4°C	Παραμονή (Hold)	

5. Η ανίχνευση των PCR προϊόντων έγινε με ηλεκτροφόρηση 2,5μL DNA + 1μL ρυθμιστικό διάλυμα (Loading buffer) σε πήκτωμα αγαρόζης-TBE 2% με βρωμιούχο αιθίδιο (10 mg/mL) 6 μL σε 100 mL πηκτώματος αγαρόζης και ηλεκτροφόρηση στα 100V για περίπου 1,5 ώρα. Χρησιμοποιήθηκε κλίμακα διαβάθμισης του μεγέθους του DNA 1 Kb Plus DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific (Ref. 10787018). Η οπτικοποίηση και φωτογράφηση των αποτελεσμάτων έγινε σε UV λάμπα.

2.8.4 Ανίχνευση γονιδίου erm(B) *με PCR*

Χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι εκκινητές

Αλληλουχία εκκινητών από τους Bley *et al.* 2011	Μέγεθος προϊόντος
erm(B)-F 5'- GAA AGG TAC TCA ACC AAA TA-3' *erm(B)*-R 5'-AGT AAC GGT ACT TAA ATT GTT TAC-3'	639bp

- Οι εκκινητές αρχικά αραιώνονται σε stock στα 100pmol/μL (100μM) και ακολούθως
- 7.5 μL+42.5 μL dH2O για συγκέντρωση 15 μM

1. Μείγμα PCR ανά δείγμα (1x mix)

5X Standard Buffer (NEB)	5,0 μL
25mM $MgCl_2$	0,25 μL
10mM dNTPs	1,0 μL
1.5U/μL Taq Pol (NEB M0273S)	0,25 μL
10 pmoles/ μL primer Erm(B)-F	1,0 μL
10 pmoles/ μLprimer Erm(B)-R	1,0 μL
RNase-free H_2O	16,5 μL
Ολικός όγκος για κάθε δείγμα	25,0 μL

2. Προσθήκη 24,5 μL από το PCRμείγμα και 0.5 μL DNA σε κάθε σωληνάριο.
3. Σύντομη περιστροφική κίνηση (spin) σε μικροφυγόκεντρο για 5 δευτερόλεπτα.
4. Πολλαπλασιασμός DNA σε θερμοκυκλοποιητή με το παρακάτω πρόγραμμα.

Συνθήκες πολλαπλασιασμού του DNA στον θερμοκυκλοποιητή			
Στάδια	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη (Initial Denaturation)	94°C	30 δευτερόλεπτα	X1
Αποδιάταξη (Denaturation)	94oC	30 δευτερόλεπτα	
Πρόσδεση εκκινητών (Annealing)	58°C	1 λεπτό	X30
Επέκταση (Extension)	68°C	1 λεπτό	
Τελική επέκταση (Final extension)	68°C	5 λεπτά	X1
Διακοπή (Pause)	4°C	Παραμονή (Hold)	

5. Η ανίχνευση των PCR προϊόντων έγινε με ηλεκτροφόρηση 2,5μL DNA + 1μL ρυθμιστικό διάλυμα (Loading buffer) σε πήκτωμα αγαρόζης-TBE 2% με βρωμιούχο αιθίδιο (10 mg/mL) 6 μL σε 100 mL πηκτώματος αγαρόζης στα 100V για περίπου 1,5 ώρα. Χρησιμοποιήθηκε κλίμακα διαβάθμισης του μεγέθους του DNA 1 Kb Plus DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific (Ref. 10787018). Η οπτικοποίηση και φωτογράφηση των αποτελεσμάτων έγινε με UV λάμπα.

2.8.5 Ανίχνευση γονιδίων mef(A) , *mef*(E) *με PCR*

Χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι εκκινητές

Αλληλουχία εκκινητών από τους Bley *et al.* 2011	Μέγεθος προϊόντος
mef(A) -F 5'-AAT ACA ACA ATT GGA AAC TTA-3'	1127bp
mef(E)-F 5'-AAG GAG TTG TGG TTC TGA-3'	506bp
mef(A) /E-R 5'-CCA ATG ATT TAC ACC GAT T-3'	

— Όλοι οι εκκινητές αρχικά αραιώνονται σε stock στα 100pmol/μL (100μM) και ακολούθως:
— 7.5 μL+42.5 μL dH2O για συγκέντρωση 15 μM

1. Μείγμα για PCR για N + 2 δείγματα (1x mix)

5X One Taq Standard Buffer (NEB)	5,0 μL
25mM $MgCl_2$	0,25 μL
10mM dNTPs	1,0 μL
1.5U/μL One Taq Pol (NEB M0273S)	0,25 μL
15 pmoles/ μL primer Mef(A) -F	1,0 μL
10 pmoles/ μL primer Mef(E) - F	1,0 μL
30 pmoles/ μL primer Mef(A) /E-R	1,0 μL
RNase-free H_2O	15,5 μL
Ολικός όγκος	25,0 μL

2. Προσθήκη 24 μL από το PCR μείγμα και 1 μL DNA σε κάθε σωληνάριο.

3. Σύντομη περιστροφική κίνηση (spin) σε μικροφυγόκεντρο για 5 δευτερόλεπτα.

4. Πολλαπλασιασμός DNA σε θερμοκυκλοποιητή με το παρακάτω πρόγραμμα:

Συνθήκες πολλαπλασιασμού του DNA στον θερμοκυκλοποιητή			
Στάδια	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη (Initial Denaturation)	95°C	30 δευτερόλεπτα	X1
Αποδιάταξη (Denaturation)	95oC	30 δευτερόλεπτα	
Πρόσδεση εκκινητών (Annealing)	52°C	1 λεπτό	X30
Επέκταση (Extension)	68°C	1 λεπτό	
Τελική επέκταση (Final extension)	68oC	5 λεπτά	X1
Διακοπή (Pause)	4°C	Παραμονή (Hold)	

5. Η ανίχνευση των PCR προϊόντων έγινε με ηλεκτροφόρηση 2,5μL DNA + 1μL ρυθμιστικό διάλυμα (Loading buffer) σε πήκτωμα αγαρόζης-TBE 1% με βρωμιούχο αιθίδιο (10 mg/mL) 6 μL σε 100 mL πηκτώματος αγαρόζης και ηλεκτροφόρηση στα 100V για περίπου 1,5 ώρα. Χρησιμοποιήθηκε δείκτης διαβάθμισης του μεγέθους του DNA 1 Kb Plus DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific (Ref. 10787018). Η οπτικοποίηση και φωτογράφηση των αποτελεσμάτων έγινε με UV λάμπα.

2.8.6 Μέθοδος πολυτοπικού προσδιορισμού αλληλουχίας (*Multilocus Sequence Typing, MLST*)

2.8.6.1 Εκχύλιση DNA και PCR

Η εκχύλιση του DNA σε 31 στελέχη *S. pneumoniae* οροτύπου 19A έγινε όπως περιγράφεται ανωτέρω (σελ. 92), σύμφωνα με το πρωτόκολλο του CDC website (http://www.cdc.gov/streplab/protocol-emm-type.html)

Για την PCR χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω ζεύγη εκκινητών των οποίων οι αλληλουχίες ελήφθησαν από την ιστοσελίδα (http://spneumoniae.mlst.net/misc/info.asp) και η προμήθειά τους έγινε από την Roche Hellas (TIB MolBiol). Επίσης χρησιμοποιήθηκε GoTaq polymerase (PROMEGA REF. M830B, 5u/μl) και μείγμα dNTPs (10mM από το καθένα) (Bioline, Ref. BIO 39044).

Αλληλουχίες εκκινητών για MLST

Γονίδιο	**Όνομα**	**Εκκινητές**	**Προϊόν PCR μέγεθος**	**Θερμοκρασία εκκινητών Annealing**
aroE	shikimate dehydrogenase	F: 5'-GCC TTT GAG GCG ACA GC-3' R: 5'-TGC AGT TCA (G/A)AA ACA T(A/T)T TCT AA-3'	479bp	50° C
gki	glucose kinase	F: 5'-GGC ATT GGA ATG GGA TCA CC-3' R: 5'-TCT CCC GCA GCT GAC AC-3'	626bp	56.6^o C
recP	transketolase	F: 5'-GCC AAC TCA GGT CAT CCA GG-3' R: 5'- TGC AAC CGT AGC ATT GTA AC-3'	572bp	61° C
ddl	D-alanine-D-alanine	F: 5'-TGC (C/T)CA AGT TCC TTA TGT GG-3' R: 5'-CAC TGG GT(G/A) AAA CC(A/T) GGC AT-3'	513bp	50° C
xpt	xanthine phosphoribo-syltransferase	F: 5'-TTA TTA GAA GAG CGC ATC CT-3' R: 5'-AGA TCT GCC TCC TTA AAT AC-3'	576bp	50° C
spi	signal peptidase I	F: 5'-TTA TTC CTC CTG ATT CTG TC-3' R: 5'-GTG ATT GGC CAG AAG CGG AA-3'	596bp	53° C
gdh	glucose-6-phosphate	F: 5'-ATG GAC AAA CCA GC(G/A/T/C) AG(C/T) TT-3' R: 5'-GCT TGA GGT CCC AT(G/A) CT(G/A/T/C) CC-3'	659bp	50° C

2.8.6.2 Καθαρισμός των PCR προϊόντων

Προστίθεται 1 μL ExoSAP-IT® (ref. 78201, 1ml) αντιδραστήριο σε 2,5μL PCR προϊόντος και ακολουθεί επεξεργασία σε θερμοκυκλοποιητή περίπου για 30 λεπτά, 15 λεπτά στους 37^oC και 15 λεπτά στους 80^oC. Τα καθαρισμένα προϊόντα φυλάσσονται στους -20° C μέχρι να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό αλληλουχίας (sequencing).

2.8.6.3 Μείγμα (master mix) για αλληλούχιση

Για την αλληλούχιση η συγκέντρωση του stock διαλύματος του εκκινητή πρέπει να είναι 3.2 pmol/μL. Παρασκευάζεται μείγμα (1X)→ Νερό 7,0 μL (distilled DNAse/RNAse free), BD ρυθμιστικό διάλυμα αλληλούχισης 1,75 μL, Εκκινητές 0,5 μL, BD ένζυμο 0,25 μL.

Από το παραπάνω μείγμα 9.5μL τοποθετείται σε κάθε πηγαδάκι της πλάκας και 0,5 μL PCR προϊόντα, η πλάκα καλύπτεται με ειδικό καπάκι και ακολουθεί πολλαπλασιασμός του DNA σε θερμοκυκλοποιητή.

Συνθήκες στο θερμοκυκλοποιητή

Στάδια	**Θερμοκρασία**	**Διάρκεια**	**Κύκλοι**
1	96° C	01:00 λεπτό	
2	96° C	00:10 δευτερόλεπτα	
3	55° C	00:05 δευτερόλεπτα	
4	60° C	04:00 λεπτά	2-4 X 25
5	4° C	Παραμονή (Hold)	

Μετά τον πολλαπλασιασμό του DNA, η πλάκα μπορεί να παραμείνει στο ψυγείο μερικές ημέρες ή ακολουθεί ο καθαρισμός των προϊόντων αλληλούχισης.

2.8.6.4 Καθαρισμός προϊόντων αλληλούχισης, προσδιορισμός και ανάγνωση αλληλουχιών και τυποποίηση κατά τύπο αλληλουχίας (STs)

Απαιτείται φρέσκο μείγμα για κάθε φάση καθαρισμού των προϊόντων αλληλούχισης. Για κάθε 10 μL προϊόντος αλληλούχισης αντιστοιχούν 40 μL μείγματος EthOH/NaOAc (1,5μL NaOAc 3M + 31,25 μL EthOH 100% + 7,25 μL dH2O). Αφαιρείται το κάλυμμα από την πλάκα, προστίθενται 40 μL μείγματος σε κάθε δείγμα, καλύπτεται η πλάκα με το κάλυμμα SEPTA, σημειώνεται η θέση του πηγαδιού A1 και παραμένει η πλάκα σε θερμοκρασία δωματίου για 20-30 λεπτά. Εν τω μεταξύ, ετοιμάζεται αντίστοιχο αντίβαρο και ετοιμάζεται η φυγόκεντρος στους 4° C. Γίνεται φυγοκέντρηση στην πλάκα στις 3.500 στροφές (rpm) για 30 λεπτά. Στη συνέχεια αφαιρείται το κάλυμμα SEPTA, αναποδογυρίζεται η πλάκα σε χαρτοπετσέτα και ακολουθεί σύντομη περιστροφική κίνηση (spin) σε μικροφυγόκεντρο για 2 λεπτά στις 1400 στροφές (rpm). Προστίθενται 70μL EthOH σε κάθε δείγμα, τοποθετείται το κάλυμμα (SEPTA) και γίνεται φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα 1400 rpm. Επαναλαμβάνεται σύντομη περιστροφική κίνηση (spin) σε μικροφυγόκεντρο για 1 λεπτό στις 1400 στροφές (rpm), αφού αφαιρεθεί το κάλυμμα SEPTA, με αναποδογυρισμένη την πλάκα σε χαρτοπετσέτα. Αφήνουμε την πλάκα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, χωρίς καπάκι, για 5 λεπτά και μετά προσθέτουμε 10μL Hi-Di Formamide σε κάθε δείγμα και η πλάκα τοποθετείται στο ψυγείο (ώρες ή λίγες ημέρες) μέχρι την ανάγνωση αλληλουχιών.

Ακολούθεί προσδιορισμός αλληλουχιών με το ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer, ανάγνωση και επεξεργασία των αλληλουχιών με το πρόγραμμα BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.1.9 (http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html), και τυποποίηση σε STs με βάση τα 7 διατηρημένα γονίδια (house-keeping genes) με τη χρήση του ιστότοπου http://spneumoniae.mlst.net. Το κλωνικό σύμπλεγμα (CC) προσδιορίστηκε με τη χρήση του αλγόριθμου eBURST από την ίδια ιστοσελίδα.

2.9 Στατιστική ανάλυση

Τα δεδομένα αναλύθηκαν με τη χρήση του SPSS 20 στατιστικού λογισμικού (SPSS Inc., Chicago, ILL, USA). Για τις κατηγορικές μεταβλητές χρησιμοποιήθηκε το x^2 και για τις συνεχείς μεταβλητές το *student t-test* (για τις κανονικά κατανεμημένες) ή το *Mann-Whitney U* (για τις μη κανονικά κατανεμημένες). Η επίπτωση των διεισδυτικών πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων κατά τη χρονική περίοδο της μελέτης εκφράστηκε σε νέες περιπτώσεις/1000 εισαγωγές. Η τάση της μεταβολής της επίπτωσης και το επίπεδο της μεταβολής, πριν από και μετά την ένταξη των συζευγμένων εμβολίων στο εθνικό πρόγραμμα εμβολιασμού, εξετάστηκαν με ανάλυση χρονολογικών σειρών (interrupted time series analysis, ITSA) (Biglan και συν., 2000). Επιπρόσθετα, με ITSA εξετάστηκαν και οι μεταβολές στη συχνότητα των οροτύπων πριν από και μετά την είσοδο των συζευγμένων εμβολίων. Η ITSA έγινε με το πρόγραμμα STATA για Windows. Στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα θεωρήθηκαν αυτά με τιμή $p < 0,05$.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Χαρακτηριστικά ασθενών

Από τα 2622 παιδιά με επιβεβαιωμένη με καλλιέργεια πνευμονιοκοκκική λοίμωξη, τα 1875 (71,5%) πληρούσαν τις προϋποθέσεις και συμπεριελήφθησαν στη μελέτη. Στα παιδιά αυτά ήταν διαθέσιμα τα δημογραφικά στοιχεία, ήταν γνωστά η εστία της λοίμωξης και το βιολογικό υλικό απομόνωσης του πευμονιοκόκκου και τα στελέχη ήταν διαθέσιμα για ανακαλλιέργεια και περαιτέρω έλεγχο. Από τους 1875 ασθενείς οι 1018 αφορούσαν την περίοδο 1986-2005, πριν την εφαρμογή του 7-δυνάμου συζευγμένου εμβολίου (PCV7) έναντι του πνευμονιοκόκκου (Prevenar), οι 450 την περίοδο 2006-2010 μετά την εφαρμογή του PCV7 και πριν την εφαρμογή του 10-δυνάμου (Synflorix) και 13-δυνάμου (Prevenar13) και τέλος οι 407 την περίοδο 2011-2015 μετά την εφαρμογή των PCV10 και PCV13.

Από τα 1875 παιδιά που μελετήθηκαν τα 1034 ήταν αγόρια και τα 841 κορίτσια, η μέση ηλικία των ασθενών ήταν 33,92 μήνες και η διάμεση 24,0 (εύρος 1-162) μήνες. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της μέσης ηλικίας των ασθενών στις δύο τελευταίες περιόδους (Πίνακας 8). Από τους 953 ασθενείς με διεισδυτική λοίμωξη, 186 έπασχαν από μηνιγγίτιδα, 300 από βακτηριαιμία, 360 από πνευμονία, 92 από μαστοειδίτιδα, 13 από αρθρίτιδα ή οστεομυελίτιδα και 2 από περιτονίτιδα. Τα υπόλοιπα 922 παιδιά έπασχαν από οξεία μέση πυώδη ωτίτιδα. Τα χαρακτηριστικά των ασθενών, η πηγή απομόνωσης του πνευμονιοκόκκου και η εμβολιαστική κάλυψη των παιδιών φαίνονται στον πίνακα 8, στις διάφορες χρονικές περιόδους, πριν από και μετά τη διαθεσιμότητα των συζευγμένων πνευμονιοκοκκικών εμβολίων. Η εμβολιαστική κάλυψη με συζευγμένα πνευμονιοκοκκικά εμβόλια σε σχέση με την ηλικία των παιδιών κατά τη χρονική περίοδο της λοίμωξης φαίνονται στον πίνακα 9. Από 857 παιδιά που νόσησαν μετά το 2005 (έτος διαθεσιμότητας των PCVς), το 48,9% είχε λάβει τουλάχιστον μία δόση PCV και το 26,8% είχε λάβει ≥3 δόσεις PCV.

Πίνακας 8. Χαρακτηριστικά 1875 παιδιών με πνευμονιοκοκκική νόσο κατά τη χρονική περίοδο 1986-2015

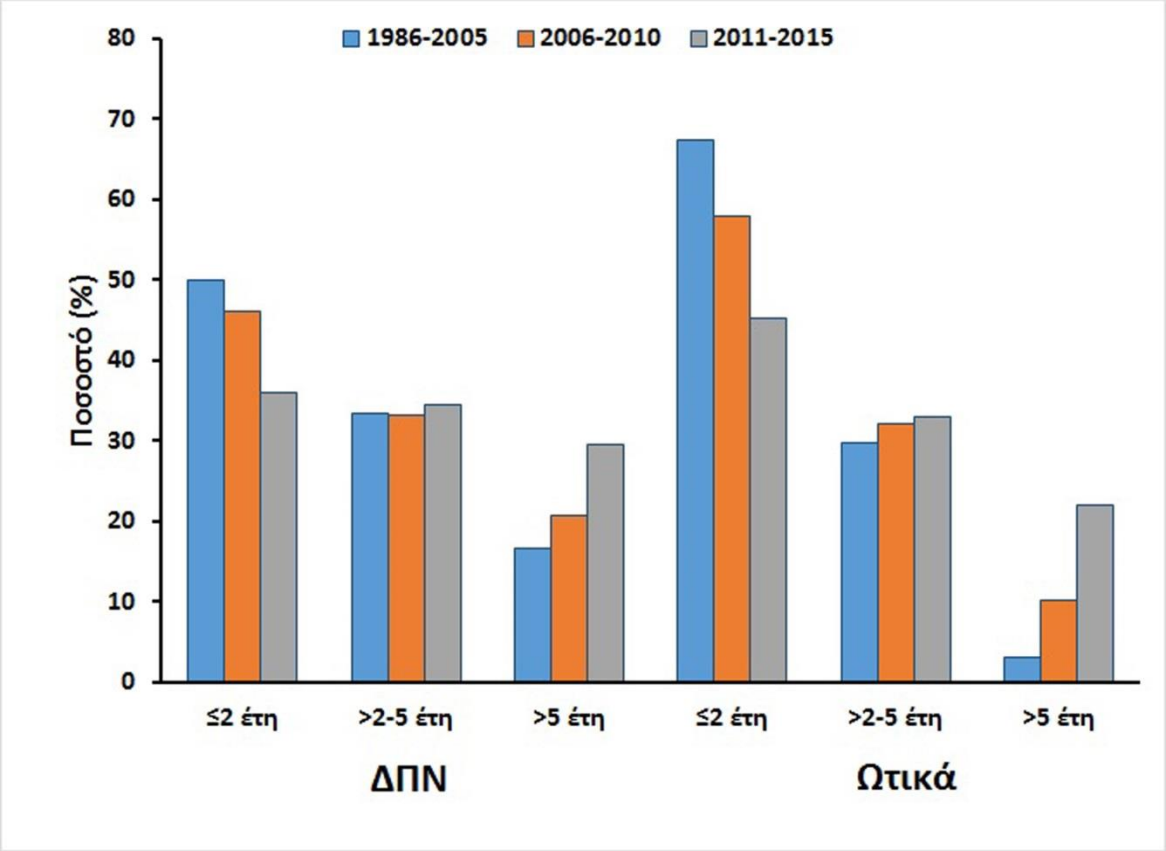
Χαρακτηριστικά	**1986-2015 (N=1875)**	**1986-2005 (N=1018)**	**2006-2010 (N=449)**	**2011-2015 (N=408)**
Φύλο				
Άρρενες	1034	575	245	214
Θήλεα	841	443	204	194
Ηλικία, μήνες				
Μέσος όρος	33,92	30	34	43
Διάμεσος (εύρος)	24 (1-162)	23 (1-162)	24 (1-157)	34 (1-160)
Πηγή απομόνωσης				
Εγκεφαλονωτιαίο υγρό	172	132	18	22
Αίμα	648	383	165	100
Πλευριτικό υγρό	39	28	9	2
Αρθρικό/από οστούν	9	7	1	1
Υγρό από μέσο ους	972	451	249	272
Πύο από μαστοειδή	33	17	7	9
Περιτοναϊκό υγρό	2	0	0	2
Είδος λοίμωξης				
Μηνιγγίτιδα	186	143	21	22
Βακτηριαιμία	300	158	86	56
Πνευμονία	360	236	81	43
Αρθρίτιδα/οστεομυελίτιδα	13	11	1	1
Μέση πυώδης ωτίτιδα	922	425	236	261
Μαστοειδίτιδα	92	45	24	23
Περιτονίτιδα	2	0	0	2
Δόσεις Εμβολίου				
Παιδιά ≤2 ετών				
0	807	589	125	93
1	31	0	22	9
2	57	0	40	17
≥3	104	0	50	54
Παιδιά >2 ετών				
0	652	428	123	101
1	50	0	39	11
2	47	0	28	19
≥3	126	0	22	104

Πίνακας 9. Εμβολιαστική κάλυψη με συζευγμένα πνευμονιοκοκκικά εμβόλια σε σχέση με την ηλικία των παιδιών κατά τη χρονική περίοδο της λοίμωξης

Είδος εμβολίου	≤2 ετών (N=193)			> 2 ετών (N=223)		
	1 δόση	2 δόσεις	≥3 δόσεις	1 δόση	2 δόσεις	≥3 δόσεις
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
PCV7	23 (11,9)	35 (18,1)	56 (29,0)	49 (22,0)	43 (19,3)	86 (38,6)
PCV10	0 (0,0)	8 (4,2)	2 (1,0)	1 (0,4)	0 (0,0)	1 (0,4)
PCV13	8 (4,2)	14 (7,3)	39 (20,2)	0 (0,0)	4 (1,8)	24 (10,8)
PCV7, PCV13*	0 (0,0)	0 (0,0)	6 (3,1)*	0 (0,0)	0 (0,0)	13 (5,8)*
PCV10, PCV13*	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,5)*	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (0,9)*
Σύνολο	31 (16,1)	57 (29,6)	104 (53,8)	50 (22,4)	47 (21,1)	126 (56,5)

**Στις ηλικίες ≤2 ετών 3 ασθενείς εμβολιάσθηκαν με τρεις δόσεις PCV7 και 1 δόση PCV13, 3 ασθενείς με 2 δόσεις PCV7 και 1 δόση PCV13 και ένας ασθενής με 1 δόση PCV10 και 3 δόσεις PCV13. Στις ηλικίες άνω των 2 ετών 10 ασθενείς εμβολιάσθηκαν με 3 δόσεις PCV7 και μία δόση PCV13, ένας ασθενής με 4 δόσεις PCV7 και μία δόση PCV13, δύο ασθενείς με 2 δόσεις PCV7 και μία δόση PCV13, ένας ασθενής με τρεις δόσεις PCV10 και μία δόση PCV13 και ένας ασθενής με 1 δόση PCV10 και 3 δόσεις PCV13.*

Η κατανομή των πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων ανά ηλικιακή ομάδα πριν (1986-2005) και μετά την εισαγωγή του PCV7 (2006-2010) και των PCV10 και PCV13 (2011-2015), φαίνονται στο σχήμα 5. Συνολικά, υψηλότερα ποσοστά πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων παρατηρούνται στα παιδιά ≤ 2 ετών, έπονται τα παιδιά 2-5 ετών και τέλος ακολουθούν τα παιδιά >5 ετών. Πιο συγκεκριμένα όσον αφορά τις ΔΠΝ, κατά την πρώτη χρονική περίοδο το 50% των λοιμώξεων παρατηρήθηκε στην ηλικιακή ομάδα ≤ 2 ετών, το 33.50% σε παιδιά 2-5 ετών και μόνο το 16.55% των ΔΠΝ παρατηρήθηκε στην ομάδα >5 ετών. Παρόμοιες διαφορές παρατηρήθηκαν και κατά τη δεύτερη χρονική περίοδο, ενώ κατά την τρίτη χρονική περίοδο οι διαφορές μεταξύ των ομάδων ελαττώθηκαν. Όσον αφορά τις ωτίτιδες, οι διαφορές μεταξύ των ηλικιακών ομάδων παρέμειναν σημαντικές και στις τρεις χρονικές περιόδους, υψηλότερες στην ομάδα ≤ 2 ετών και χαμηλότερες στην ομάδα >5 ετών.



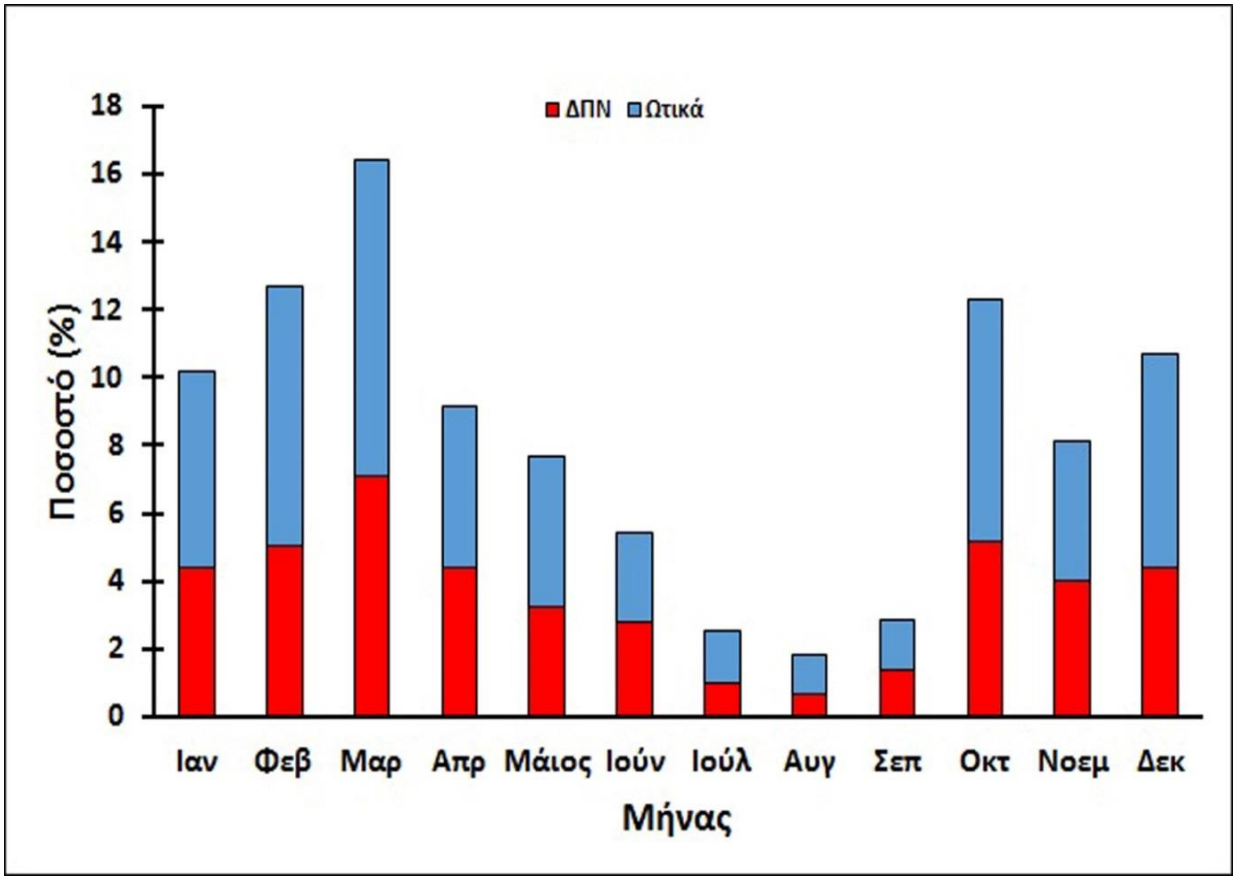
Σχήμα 5. Κατανομή πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων ανά ηλικιακή ομάδα σε τρεις χρονικές περιόδους πριν και μετά την εισαγωγή των PCVs.

3.2 Επιδημιολογία

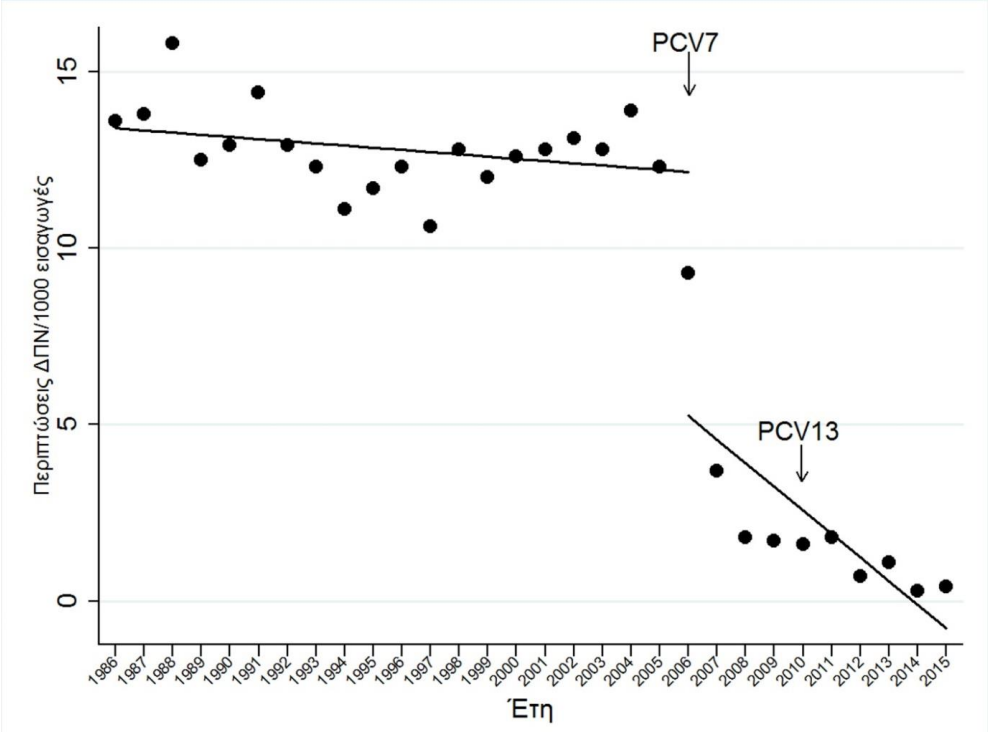
Όπως φαίνεται στο σχήμα 6, τόσο οι διεισδυτικές πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις όσο και οι ΜΠΩ ήταν συχνότερες τους χειμερινούς μήνες σε σύγκριση με τους θερινούς. Συγκεκριμένα, το 70.5% των λοιμώξεων (το 30.2% των διεισδυτικών λοιμώξεων και το 40.3% των ωτιτίδων) παρατηρήθηκαν την περίοδο Οκτωβρίου-Μαρτίου ενώ κατά τη χρονική περίοδο Απριλίου-Σεπτεμβρίου παρατηρήθηκε το 29.5% των πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων.

Η επίπτωση των διεισδυτικών πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων και της πνευμονιοκοκκικής μηνιγγίτιδας κατά την χρονική περίοδο 1986-2015 σε σχέση με την ένταξη των PCVs φαίνεται στα σχήματα 7 και 8 αντίστοιχα. Η ετήσια επίπτωση των διεισδυτικών λοιμώξεων ελαττώθηκε μετά την εφαρμογή των PCVs από 12,3 περιπτώσεις/1000 εισαγωγές το 2005 σε 0,4 περιπτώσεις /1000 εισαγωγές το 2015 ($p < 0,001$). Στην ανάλυση χρονολογικών σειρών διαπιστώθηκε σημαντική αύξηση στο ρυθμό μείωσης της επίπτωσης ($p < 0,028$) και σημαντική ελάττωση στο επίπεδο ($p < 0,0001$). Όσον αφορά την μηνιγγίτιδα, στην

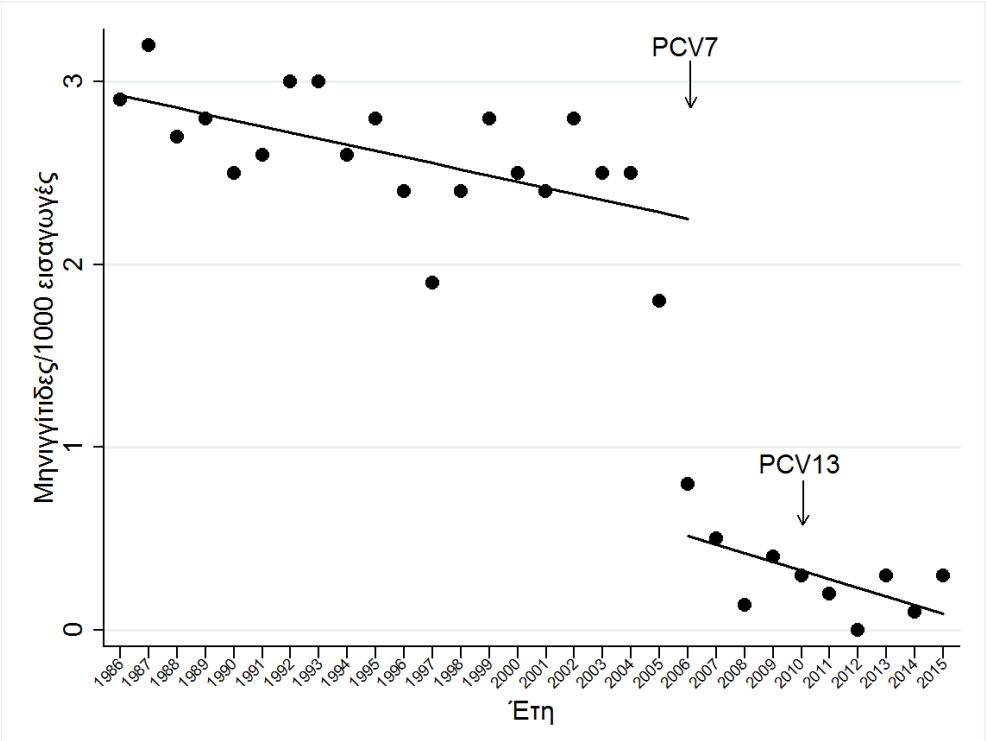
ανάλυση χρονολογικών σειρών δεν επηρεάστηκε σημαντικά ο ρυθμός της μείωσης (p< 0,547), διαπιστώθηκε όμως σημαντική μείωση στο επίπεδο της επίπτωσης (p < 0,0001).



Σχήμα 6. Μηνιαία κατανομή διεισδυτικών πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων και μέσης πυώδους ωτίτιδας κατά τη χρονική περίοδο 1986-2015.



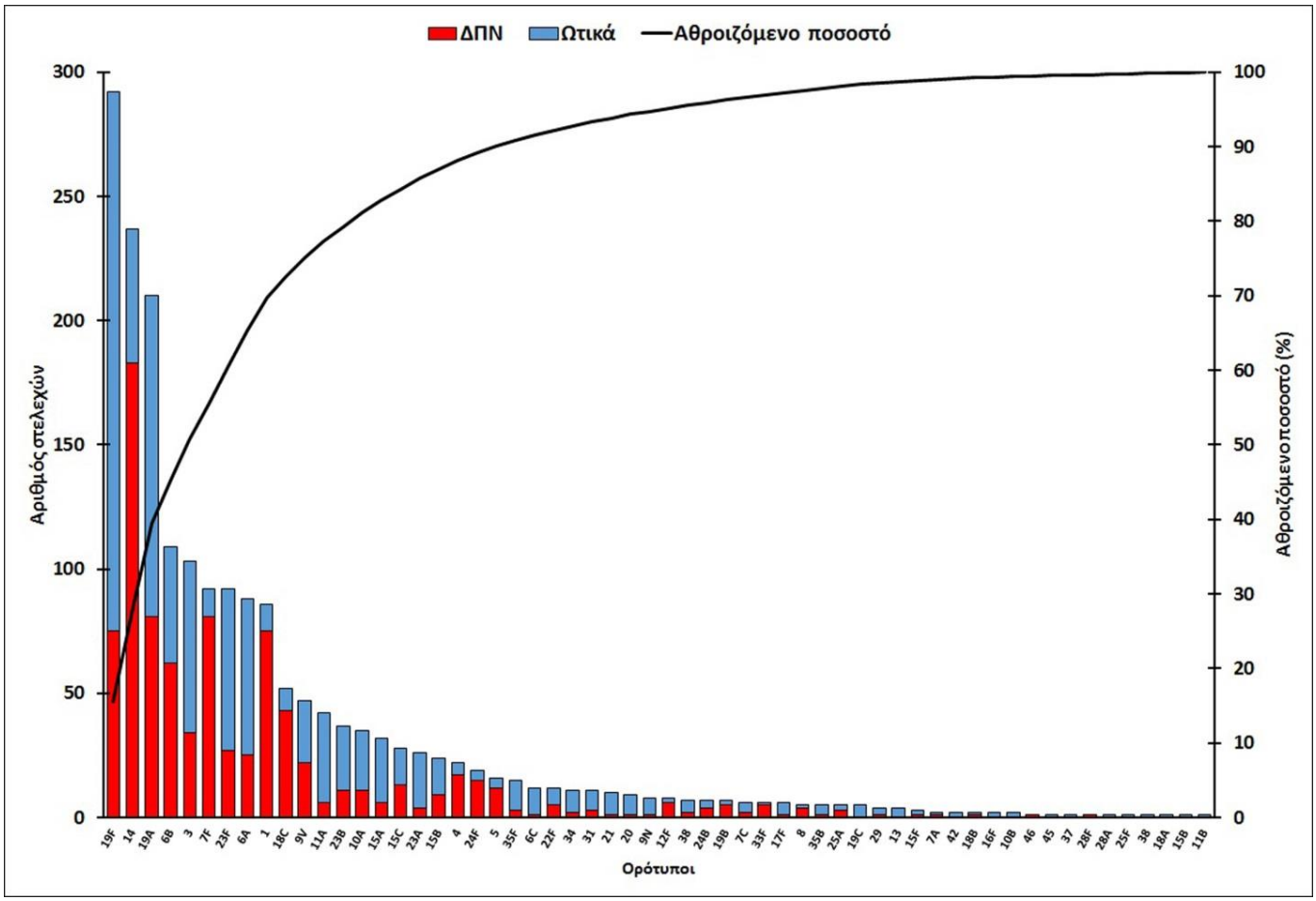
Σχήμα 7. Επίπτωση διεισδυτικών πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων στο Νοσοκομείο Παίδων «Η Αγία Σοφία» κατά την χρονική περίοδο 1986-2015. Στην ανάλυση χρονολογικών σειρών διαπιστώθηκε σημαντική αύξηση στο ρυθμό μείωσης της επίπτωσης ($p < 0,028$) και σημαντική ελάττωση στο επίπεδο ($p < 0,0001$). Τα βέλη υποδεικνύουν το έτος ένταξης των PCVs στο Εθνικό Πρόγραμμα Εμβολιασμών.



Σχήμα 8. Επίπτωση πνευμονιοκοκκικής μηνιγγίτιδας στο Νοσοκομείο Παίδων «Η Αγία Σοφία» από 1986-2015. Στην ανάλυση χρονολογικών σειρών δεν επηρεάστηκε σημαντικά ο ρυθμός της μείωσης ($p < 0,547$) διαπιστώθηκε όμως σημαντική μείωση στο επίπεδο της επίπτωσης ($p < 0,0001$). Τα βέλη υποδεικνύουν το έτος ένταξης των PCVs στο Εθνικό Πρόγραμμα εμβολιασμών.

3.3 Ορότυποι

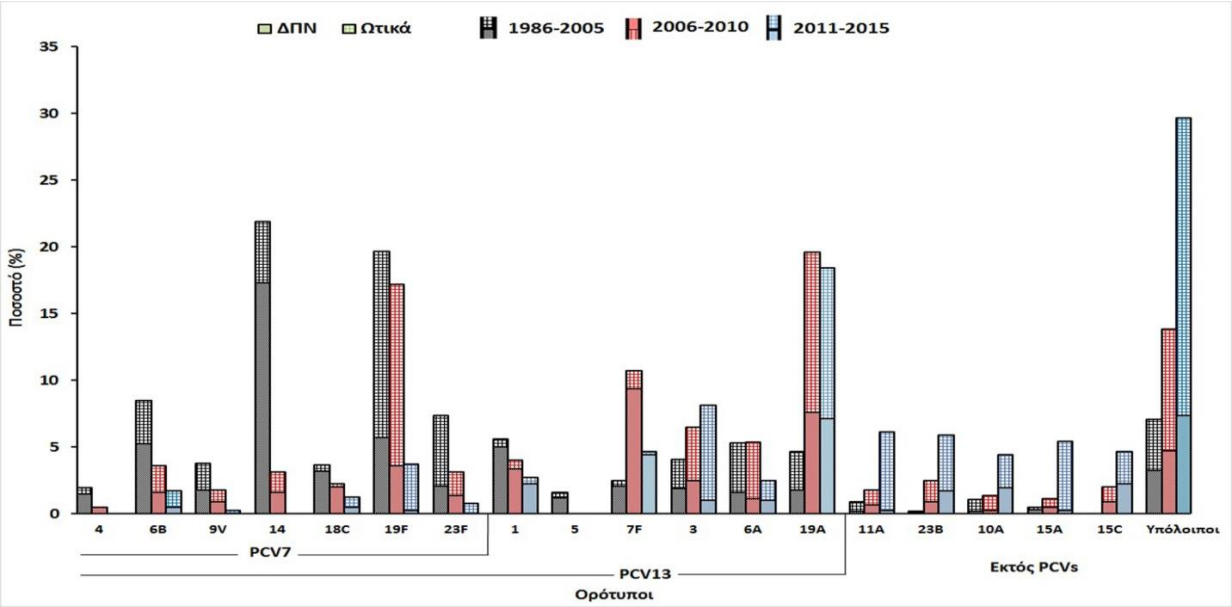
Η κατανομή των οροτύπων στα 1875 στελέχη πνευμονιοκόκκου από ΔΠΝ και από ωτίτιδα φαίνονται στο σχήμα 9. Το 77,3% των λοιμώξεων προκλήθηκε από 12 οροτύπους: 19F, 14, 19A, 6B, 3, 7F, 23F, 6A, 1, 18C και 11A. Από αυτούς ο 14, 7F, 1, 19A. 19F, 6B, 18C και 3 απομονώθηκαν συχνότερα από παιδιά με ΔΠΝ και οι 19F, 19A, 3, 23F, 6A, 6B, 14 και 11A από παιδιά με οξεία ΜΠΩ. Κατά την περίοδο 1986-2005 το 67,8% των ΔΠΝ και το 65,4% των ωτιτίδων προκλήθηκαν από οροτύπους που περιλαμβάνονται στο PCV7.



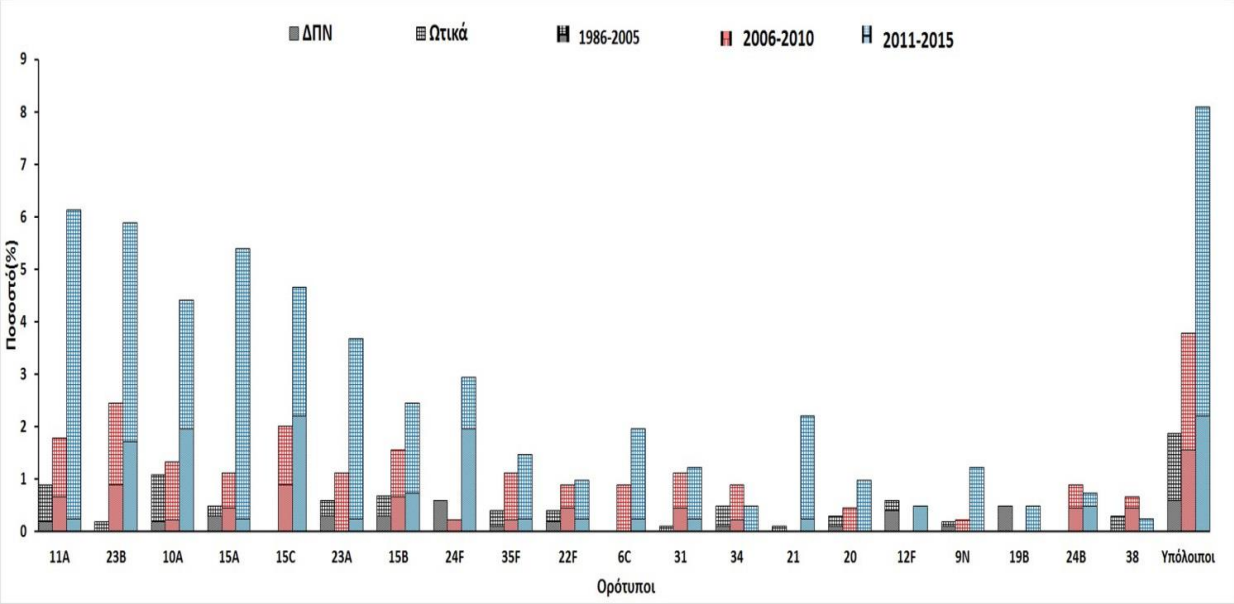
Σχήμα 9. Κατανομή οροτύπων σε 1875 στελέχη πνευμονιοκόκκου από διεισδυτικές λοιμώξεις (ΔΠΝ) και από ωτίτιδα. Οι στήλες αντιπροσωπεύουν αριθμό στελεχών και η γραμμή αντιπροσωπεύει αθροιζόμενα ποσοστά ανά ορότυπο.

Η κατανομή των οροτύπων πνευμονιοκόκκου στα 1875 στελέχη κατά τις χρονικές περιόδους 1986-2005, 2006-2010, 2011-2015 φαίνεται στα σχήματα 10 και 11. Οι επικρατέστεροι ορότυποι κατά την πρώτη περίοδο (1986-2005) ήταν για μεν τις ΔΠΝ οι 14 (17,3%), 6B (5,2%), 19F (5,7%) και 1 (5,0%), για δε την ΜΠΩ οι 19F (13,9%), 23F (5,3%), 6A (3,7%), 14 (4,6%), 6B (3.24%). Κατά τη 2η περίοδο (2006-2010) όσον αφορά τις ΔΠΝ υπήρξε σημαντική

ελάττωση του 14 (από 17.3 σε 1.6%) και αύξηση του 7F (από 2,06 σε 9.40%) και του 19A (από 1,77% σε 7,60%). Για την ΜΠΩ ο 19F (13.6%) και ο 6A (4,2%) δεν επηρεάσθηκαν σημαντικά ενώ σημείωσαν σημαντική αύξηση ο 19A από 2,8% σε 12,0% και ο 3 από 2.2 σε 4,0%. Τέλος κατά την 3η περίοδο για μεν τις ΔΠΝ ο 7F είχε σημαντική πτώση, από 9,4% σε 4,4% και ο 19A ελάχιστη από 7,6% σε 7,1%, ενώ εμφανίστηκαν άλλοι ορότυποι εκ των οποίων οι συχνότεροι ήταν οι 10A, 15C και 23B. Για την ΜΠΩ οι ορότυποι 3, 11A, 23B, 15A σημείωσαν άνοδο ενώ ο 19A έδειξε τάση πτώσης.

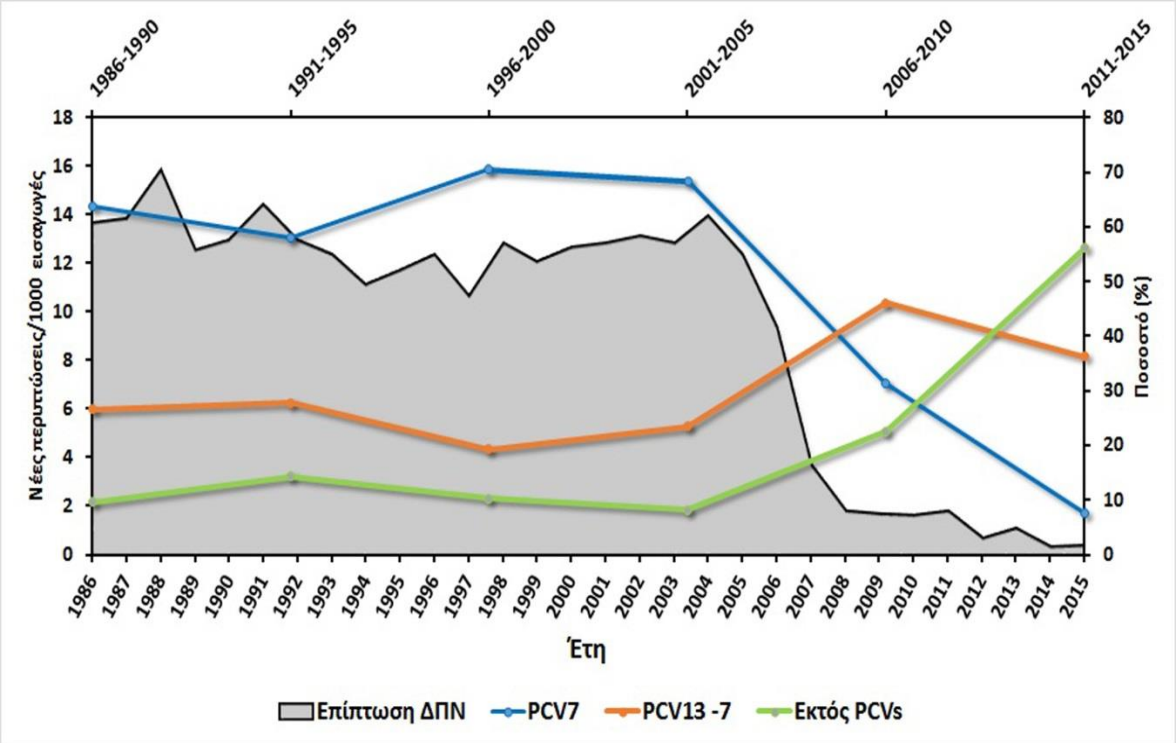


Σχήμα 10. Κατανομή οροτύπων πνευμονιοκόκκου σε 1875 στελέχη από ΔΠΝ και ωτίτιδα κατά τις χρονικές περιόδους 1986-2005, 2006-2010, 2011-2015.



Σχήμα 11. Κατανομή οροτύπων πνευμονιοκόκκου που δεν περιλαμβάνονται στα συζευγμένα εμβόλια από ΔΠΝ και ωτίτιδα κατά τις χρονικές περιόδους 1986-2005, 2006-2010, 2011-2015.

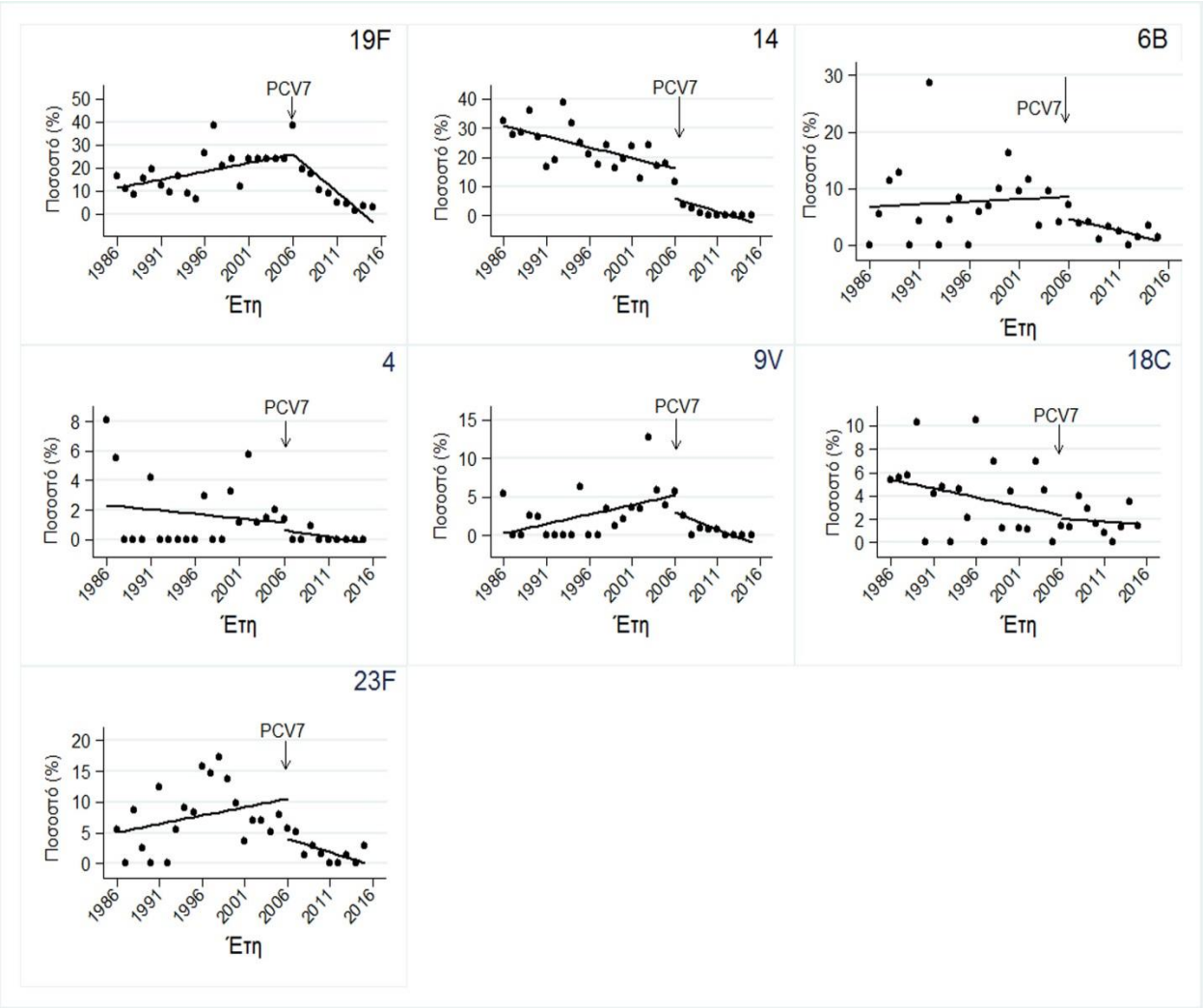
Τα ποσοστά των οροτύπων που περιλαμβάνονται στο PCV7 ελαττώθηκαν σημαντικά μετά την εφαρμογή του εν λόγω εμβολίου από 67,8% σε 26,4% και 4% για τις ΔΠΝ και από 65,4% σε 35,2% και 9,2% για τις ωτίτιδες, τις χρονικές περιόδους 1986-2005, 2006-2010 και 2011-2015 αντίστοιχα (Σχήμα 10). Όσον αφορά το PCV13 τα ποσοστά κάλυψης ήταν για την πρώτη χρονική περίοδο (1986-2005) 92,7% και 87,4% για τις ΔΠΝ και ωτίτιδες αντίστοιχα. Μετά την εφαρμογή του PCV13 τα ποσοστά κάλυψης, κατά την χρονική περίοδο 2011-2015, ελαττώθηκαν σε 55,2% και 38,9%, για τις ΔΠΝ και ωτίτιδες αντίστοιχα (Σχήμα 10). Στο σχήμα 12 αποτυπώνεται η ελάττωση των οροτύπων που περιλαμβάνονται στο PCV7 και PCV13 σε σχέση με την επίπτωση των ΔΠΝ και η αύξηση των οροτύπων που δεν περιλαμβάνονται στα εν λόγω εμβόλια.



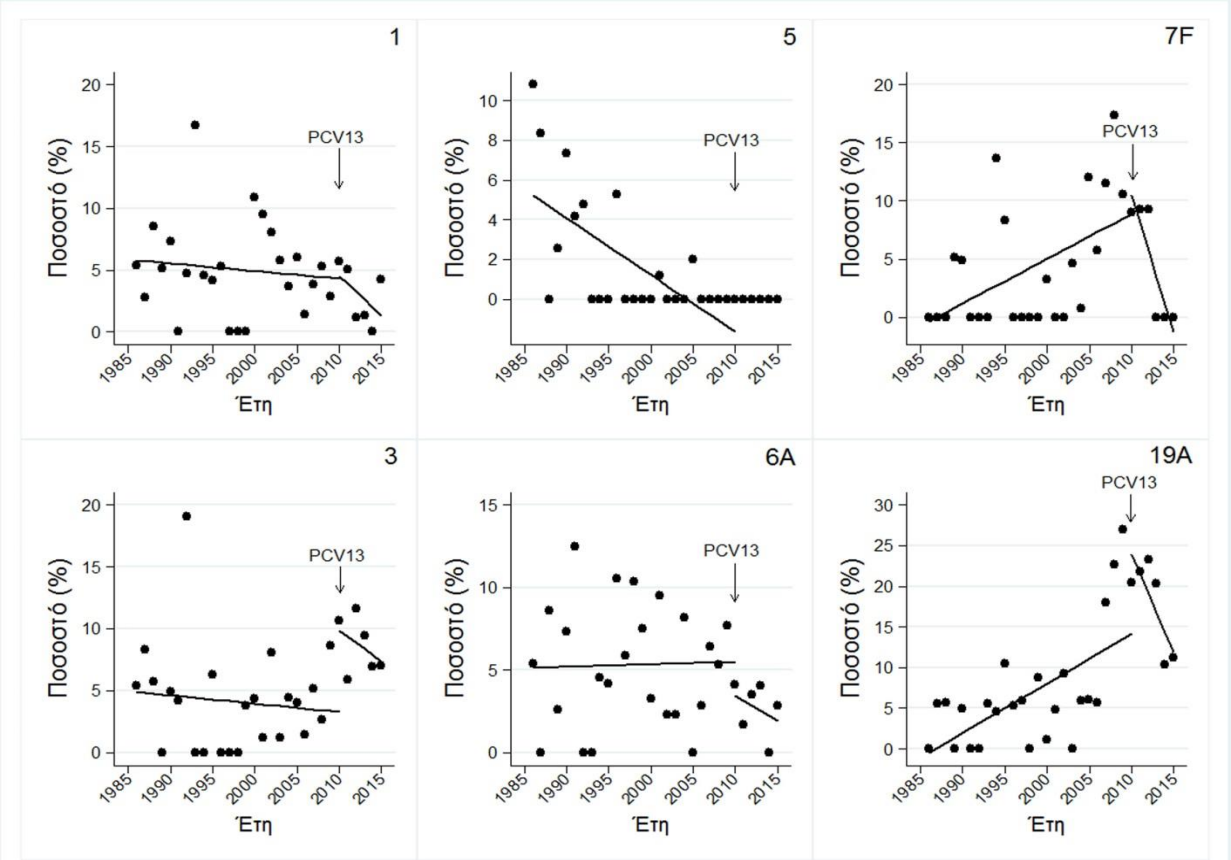
Σχήμα 12. Επιπολασμός οροτύπων που περιλαμβάνονται ή μη στο PCV7 και PCV13 σε σχέση με την επίπτωση της διεισδυτικής πνευμονικοκικής νόσου (ΔΠΝ).

Η επίδραση του PCV7 κατά τη περίοδο 1986-2015 στον επιπολασμό των οροτύπων του πνευμονιοκόκκου που περιλαμβάνονται στο εν λόγω εμβόλιο φαίνονται στο σχήμα 13. Στην ανάλυση χρονολογικών σειρών διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση στο ρυθμό μείωσης των οροτύπων 19F (p < 0,0001), 9V (p = 0,005) και 23F (p = 0,012). Το επίπεδο του επιπολασμού μειώθηκε στατιστικά σημαντικά στους οροτύπους 14 (p < 0,0001) και 23F (p = 0,032).

Η επίδραση του PCV13 κατά τη περίοδο 1986-2015 στον επιπολασμό των έξι επιπλέον οροτύπων του πνευμονιοκόκκου που περιλαμβάνονται στο εν λόγω εμβόλιο φαίνονται στο σχήμα 14. Στην ανάλυση χρονολογικών σειρών διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση στο ρυθμό μείωσης των οροτύπων 5 (p = 0,007), 7F (p < 0,0001), και 19A (p < 0,0001). Το επίπεδο του επιπολασμού αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά στον ορότυπο 3 (p < 0,0001).



Σχήμα 13. Η επίδραση του PCV7 κατά τη περίοδο 1986-2015 στον επιπολασμό των οροτύπων του πνευμονιοκόκκου, που περιλαμβάνονται στο εν λόγω εμβόλιο. Στην ανάλυση χρονολογικών σειρών διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση στο ρυθμό μείωσης των οροτύπων 19F (p<0,0001), 9V (p = 0,005) και 23F (p = 0,012). Το επίπεδο του επιπολασμού μειώθηκε στατιστικά σημαντικά στους οροτύπους 14 (p < 0,0001) και 23F (p = 0,032). Τα βέλη υποδεικνύουν το έτος ένταξης του PCV7 στο Εθνικό Πρόγραμμα Εμβολιασμών.



Σχήμα 14. Η επίδραση του PCV13 κατά τη περίοδο 1986-2015 στον επιπολασμό των οροτύπων του πνευμονιοκόκκου, που περιλαμβάνονται στο εν λόγω εμβόλιο. Στην ανάλυση χρονολογικών σειρών διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση στο ρυθμό μείωσης των οροτύπων 5 (p = 0,007), 7F (p < 0,0001), και 19A (p < 0,0001). Το επίπεδο του επιπολασμού αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά στον ορότυπο 3 (p < 0,0001). Τα βέλη υποδεικνύουν το έτος ένταξης του PCV13 στο Εθνικό Πρόγραμμα Εμβολιασμών.

Αξίζει να σημειωθεί ότι από τα 142 παιδιά που νόσησαν, (56 ≤ 2 ετών και 86 > 2 ετών) και είχαν εμβολιασθεί με ≥3 δόσεις του PCV7, μόνο 7 νόσησαν από οροτύπους που περιλαμβάνονται στο εμβόλιο. Τα υπόλοιπα 135 νόσησαν από οροτύπους που δεν περιλαμβάνονται σε αυτό. Τα τέσσερα ≤ 2 ετών νόσησαν με ωτίτιδα από ορότυπο 19F, ενώ δύο από τα τρία >2 ετών νόσησαν με ωτίτιδα από οροτύπους 19F και 23F αντίστοιχα και ένα με μαστοειδίτιδα από ορότυπο 19F. Όσον αφορά το PCV13 από τα 63 παιδιά που νόσησαν (39 ≤ 2 ετών και 24 >2 ετών) και είχαν εμβολιασθεί με ≥3 δόσεις, τα 12 (11 ≤ 2 και ένα >2 ετών) νόσησαν από οροτύπους που περιλαμβάνονται στο εμβόλιο και τα 51 από οροτύπους εκτός PCV13. Τα έντεκα ≤ 2 ετών νόσησαν, τρία με μαστοειδίτιδα και τρία με ωτίτιδα, από ορότυπο 19A, τρία με ωτίτιδα από ορότυπο 3, ένα με μικροβιαιμία και ένα με ωτίτιδα από ορότυπο 6A. Ενώ ένα παιδί >2 ετών νόσησε με ωτίτιδα από ορότυπο 19A. Τέλος, θα πρέπει να σημειωθεί ότι από τα 5 παιδιά που είχαν εμβολιασθεί με ≥3 δόσεις με το PCV10 και νόσησαν, μόνο ένα νόσησε με ωτίτιδα από ορότυπο 19F και 2 παιδιά νόσησαν με πνευμονία / μικροβιαιμία από ορότυπο 19A που θεωρείται ότι καλύπτεται από το εν λόγω εμβόλιο.

3.4 Ευαισθησία στα αντιβιοτικά

Η ευαισθησία των στελεχών στα συνήθη αντιβιοτικά ανά χρονική περίοδο παρατίθενται στους πίνακες 10, 11, 12. Σημειώνεται σημαντική αύξηση της αντοχής στην πενικιλλίνη (PEN), κεφοταξίμη (CTX), ερυθρομυκίνη (ERY), κλινδαμυκίνη (CLI), τετρακυκλίνη (TET) και κοτριμοξαζόλη (SXT) κατά τις περιόδους 2006-2010 και 2011-2015 σε σχέση με την περίοδο 1986-2005, ενώ η αντοχή στη χλωραμφενικόλη ελαττώθηκε κατά 2,5 φορές. Δεν διαπιστώθηκαν ανθεκτικά στελέχη στην βανκομυκίνη (VAN), ριφαμπικίνη (RIF), μοξιφλοξασίνη (MOX) και λινεζολίδη (LZD).

Πίνακας 10. Ευαισθησία 1875 στελεχών *S. pneumoniae* στα συνήθη αντιβιοτικά ανά χρονική περίοδο

Αντιβιοτικό	Φαινότυπος	1986-2005		2006-2010		2011-2015		*p value*
		N	%	N	%	N	%	
Πενικιλλίνη	S	772	75,83	274	61,02	254	62,25	
	I	142	13,95	138	30,73	94	23,04	
	R	104	10,22	37	8,24	60	14,71	0,007
Κεφοταξίμη	S	919	90,28	380	84,63	350	85,78	
	I	90	8,84	49	10,91	39	9,56	
	R	9	0,88	20	4,45	19	4,66	<0,0001
Ερυθρομυκίνη	S	765	75,15	286	63,70	263	64,46	
	I	25	2,46	5	1,11	6	1,47	
	R	228	22,40	158	35,19	139	34,07	<0,0001
Κλινδαμυκίνη	S	956	93,91	380	84,63	317	77,70	
	R	62	6,09	69	15,37	91	22,30	<0,0001
Χλωραμφενικόλη	S	991	97,35	444	98,89	404	99,02	
	R	27	2,65	5	1,11	4	0,98	0,042
Τετρακυκλίνη	S	838	82,32	344	76,61	316	77,45	
	R	180	17,68	105	23,39	92	22,55	0,016
Κοτριμοξαζόλη	S	912	89,59	348	77,51	335	82,11	
	R	106	10,41	101	22,49	73	17,89	<0,0001
Βανκομυκίνη	S	1018	100,00	449	100,00	408	100,00	
	R	0	0,00	0	0,00	0	0,00	NA
Ριφαμπικίνη	S	1018	100,00	449	100,00	408	100,00	
	R	0	0,00	0	0,00	0	0,00	NA
Μοξιφλοξασίνη	S	1018	100,00	448	99,78	408	100,00	
	R	0	0,00	1	0,22	0	0,00	NA
Λινεζολίδη	S	1018	100,00	449	100,00	408	100,00	
	R	0	0,00	0	0,00	0	0,00	NA
MDR	Ναι	132	12,97	89	19,82	95	23,28	<0,0001
	Όχι	886	87,03	360	80,18	313	76,72	

S: Ευαίσθητο, I: Ενδιάμεση ευαισθησία, R: Ανθεκτικό. MDR: Multidrug resistance

Πίνακας 11. Ευαισθησία 953 στελεχών *S. pneumoniae* από Διεισδυτικές λοιμώξεις στα συνήθη αντιβιοτικά ανά χρονική περίοδο

Αντιβιοτικό	Φαινό-τυπος	1986-2005		2006-2010		2011-2015		*p value*
		N	%	N	%	N	%	
Πενικιλλίνη	S	549	92,6	202	94,8	126	85,7	
	I	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
	R	44	7,4	11	5,2	21	14,3	0,005
Κεφοταξίμη	S	558	94,1	190	89,2	123	83,7	
	I	30	5,1	18	8,5	15	10,2	
	R	5	0,8	5	2,3	9	6,1	<0,0001
Ερυθρομυκίνη	S	461	77,7	158	74,2	98	66,7	
	I	13	2,2	1	0,5	2	1,4	
	R	119	20,1	54	25,4	47	32,0	0,006
Κλινταμυκίνη	S	561	94,6	190	89,2	118	80,3	<0,0001
	R	32	5,4	23	10,8	29	19,7	
Χλωραμφενικόλη	S	583	98,3	211	99,1	146	99,3	0,534
	R	10	1,7	2	0,9	1	0,7	
Τετρακυκλίνη	S	518	87,4	183	85,9	116	78,9	0,032
	R	75	12,6	30	14,1	31	21,1	
Κοτριμοξαζόλη	S	549	92,6	181	85,0	121	82,3	<0,0001
	R	44	7,4	32	15,0	26	17,7	
MDR	Όχι	539	90,9	184	86,4	116	78,9	<0,0001
	Ναι	54	9,1	29	13,6	31	21,1	

S: Ευαίσθητο, I: Ενδιάμεση ευαισθησία, R: Ανθεκτικό. MDR: Multidrug resistance

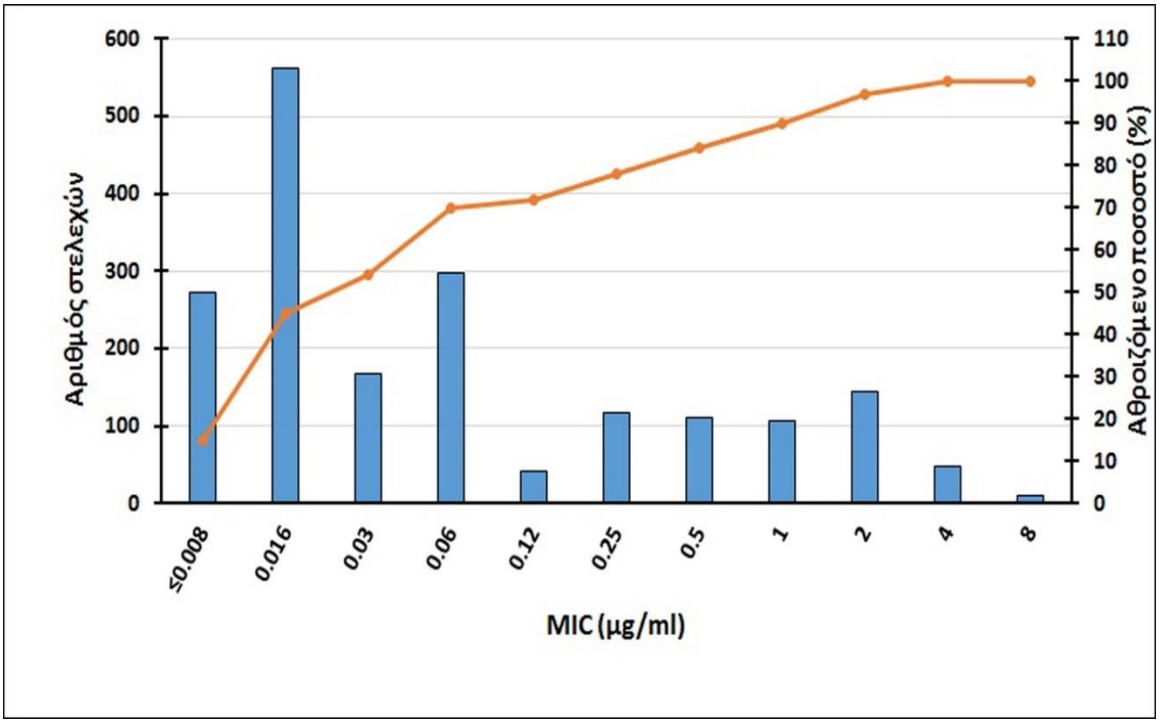
Πίνακας 12. Ευαισθησία 922 στελεχών *S. pneumoniae* από ωτίτιδες στα συνήθη αντιβιοτικά ανά χρονική περίοδο

Αντιβιοτικό	Φαινό-τυπος	1986-2005		2006-2010		2011-2015		*p value*
		N	%	N	%	N	%	
Πενικιλλίνη	S	365	85,9	210	89,0	222	85,1	
	I	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
	R	60	14,1	26	11,0	39	14,9	0,398
Κεφοταξίμη	S	361	84,9	190	80,5	227	87,0	
	I	60	14,1	31	13,1	24	9,2	
	R	4	0,9	15	6,4	10	3,8	0,001
Ερυθρομυκίνη	S	304	71,5	128	54,2	165	63,2	
	I	12	2,8	4	1,7	4	1,5	
	R	109	25,6	104	44,1	92	35,2	<0,0001
Κλινταμυκίνη	S	395	92,9	190	80,5	199	76,2	<0.0001
	R	30	7,1	46	19,5	62	23,8	
Χλωραμφενικόλη	S	408	96,0	233	98,7	258	98,9	0,025
	R	17	4,0	3	1,3	3	1,1	
Τετρακυκλίνη	S	320	75,3	161	68,2	200	76,6	0,068
	R	105	24,7	75	31,8	61	23,4	
Κοτριμοξαζόλη	S	363	85,4	167	70,8	214	82,0	<0,0001
	R	62	14,6	69	29,2	47	18,0	
MDR	Όχι	347	81,6	176	74,6	197	75,5	0,053
	Ναι	78	18,4	60	25,4	64	24,5	

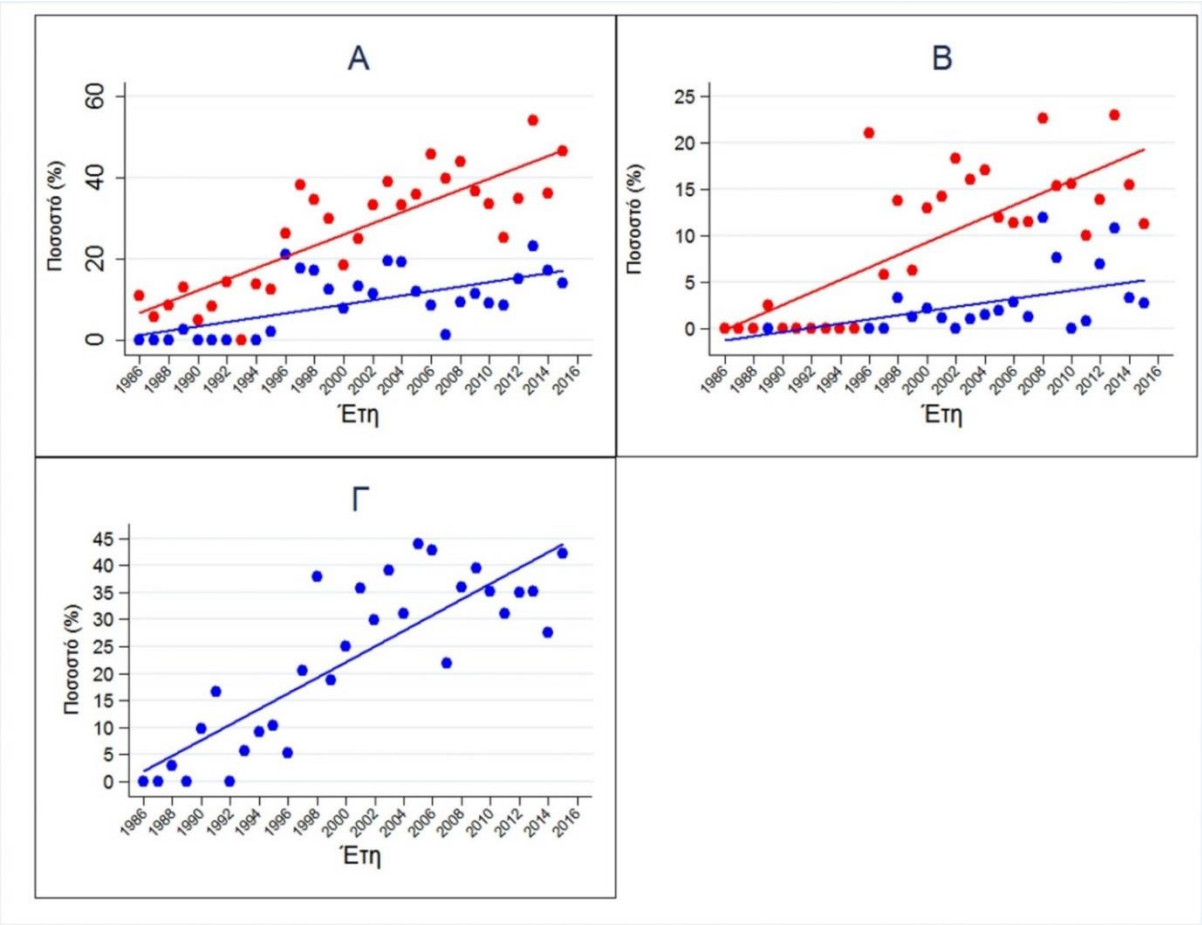
S: Ευαίσθητο, I: Ενδιάμεση ευαισθησία, R: Ανθεκτικό. MDR: Multidrug resistance

Η κατανομή των MICs στην πενικιλλίνη στα 1875 στελέχη πνευμονιοκόκκου απεικονίζεται στο σχήμα 15. Όπως φαίνεται το 69% των στελεχών ήταν ευαίσθητα στην πενικιλλίνη, το 20% είχε ενδιάμεση ευαισθησία και το 11% είχε υψηλού επιπέδου αντοχή (MIC ≥ 2 μg/mL). Στο σχήμα 16 απεικονίζεται η εξέλιξη της αντοχής του πνευμονιοκόκκου στην πενικιλλίνη (Α), στην κεφοταξίμη (Β) και στις μακρολίδες (Γ).

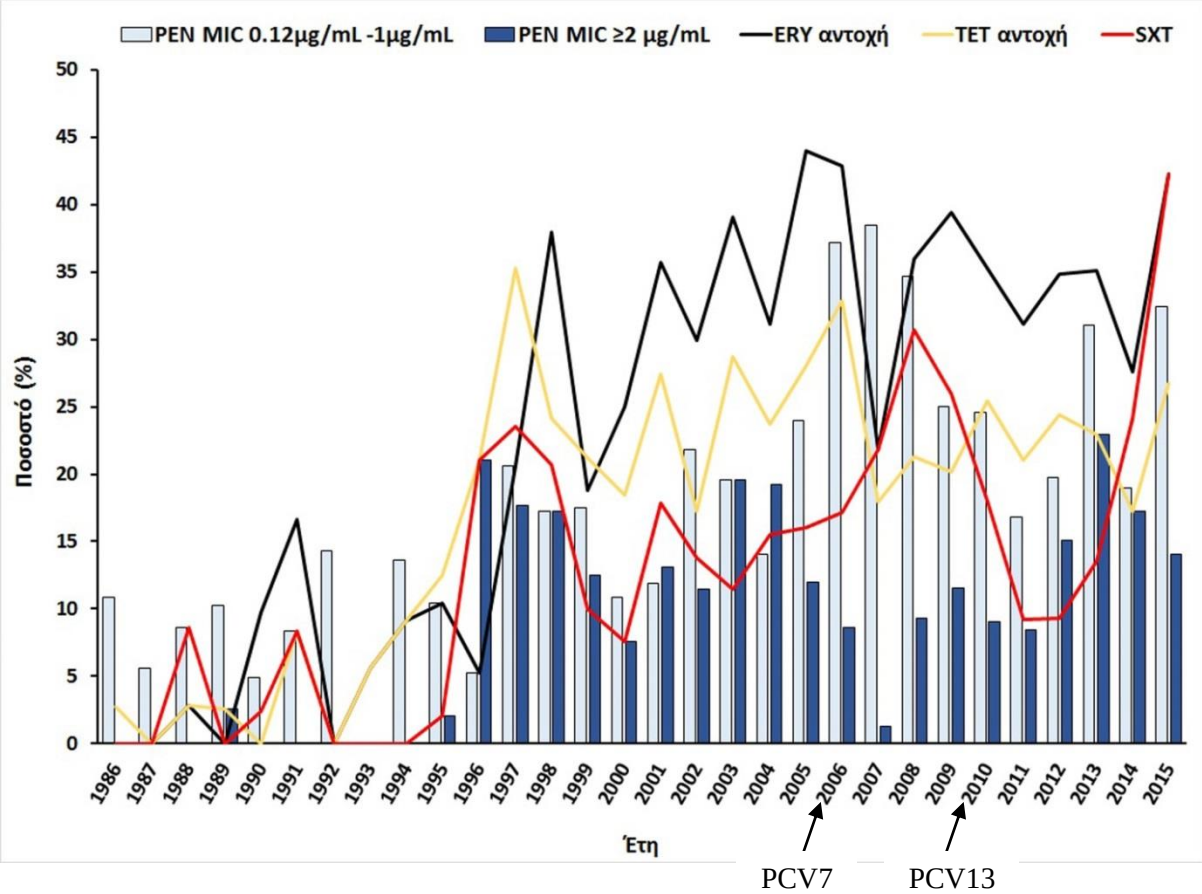
Η εξέλιξη της αντοχής στελεχών πνευμονιοκόκκου στην PEN, ERY, TET και SXT κατά τη χρονική περίοδο 1986-2015 φαίνεται στο σχήμα 17. Σημειωτέον, ότι μετά το 2005 εμφανίστηκαν πολυανθεκτικά στελέχη, τόσο από ΔΠΝ όσο και από ωτίτιδες, με αντοχή σε ≥3 ομάδες αντιβιοτικών. Η αύξηση των στελεχών αυτών ήταν στατιστικά σημαντική $p < 0,001$ (Σχήμα 18).



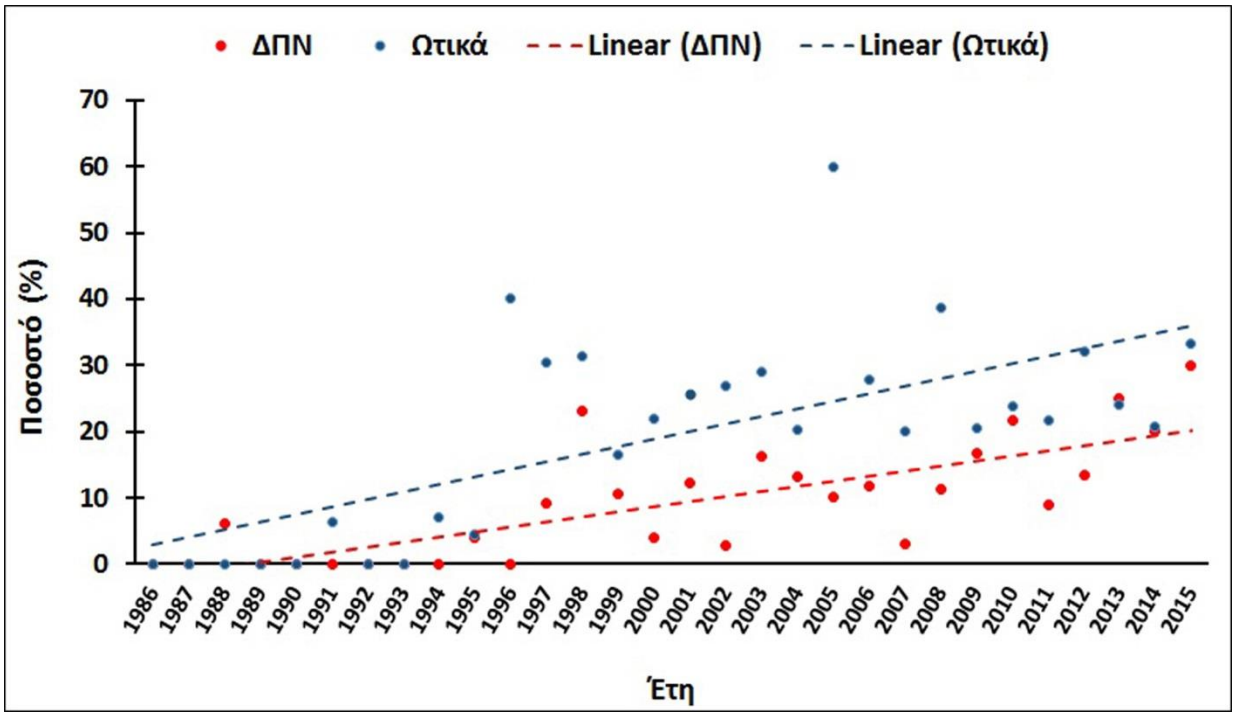
Σχήμα 15. Κατανομή MICs στην πενικιλλίνη 1875 στελεχών πνευμονιοκόκκου.



Σχήμα 16. Εξέλιξη της αντοχής του πνευμονιοκόκκου στην πενικιλλίνη (Α), στην κεφοταξίμη (Β) και στις μακρολίδες (Γ). Με κόκκινο απεικονίζονται τα ενδιάμεσης αντοχής και ανθεκτικά και με μπλε τα ανθεκτικά στελέχη.



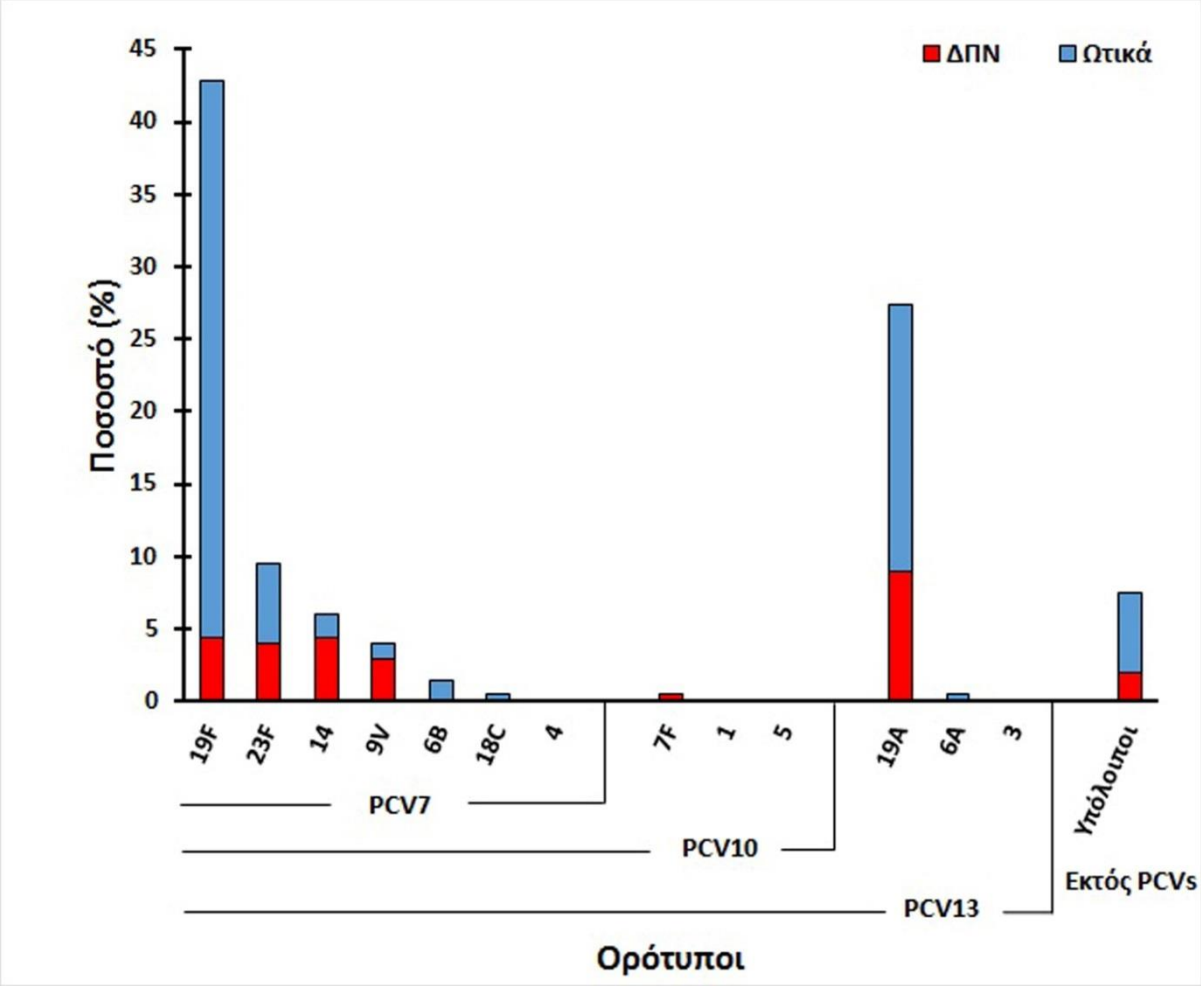
Σχήμα 17. Εξέλιξη της αντοχής στελεχών πνευμονιοκόκκου στην Πενικιλλίνη (PEN), Ερυθρομυκίνη (ERY), Τετρακυκλίνη (TET) και Κοτριμοξαζόλη (SXT) κατά τη χρονική περίοδο 1986-2015.



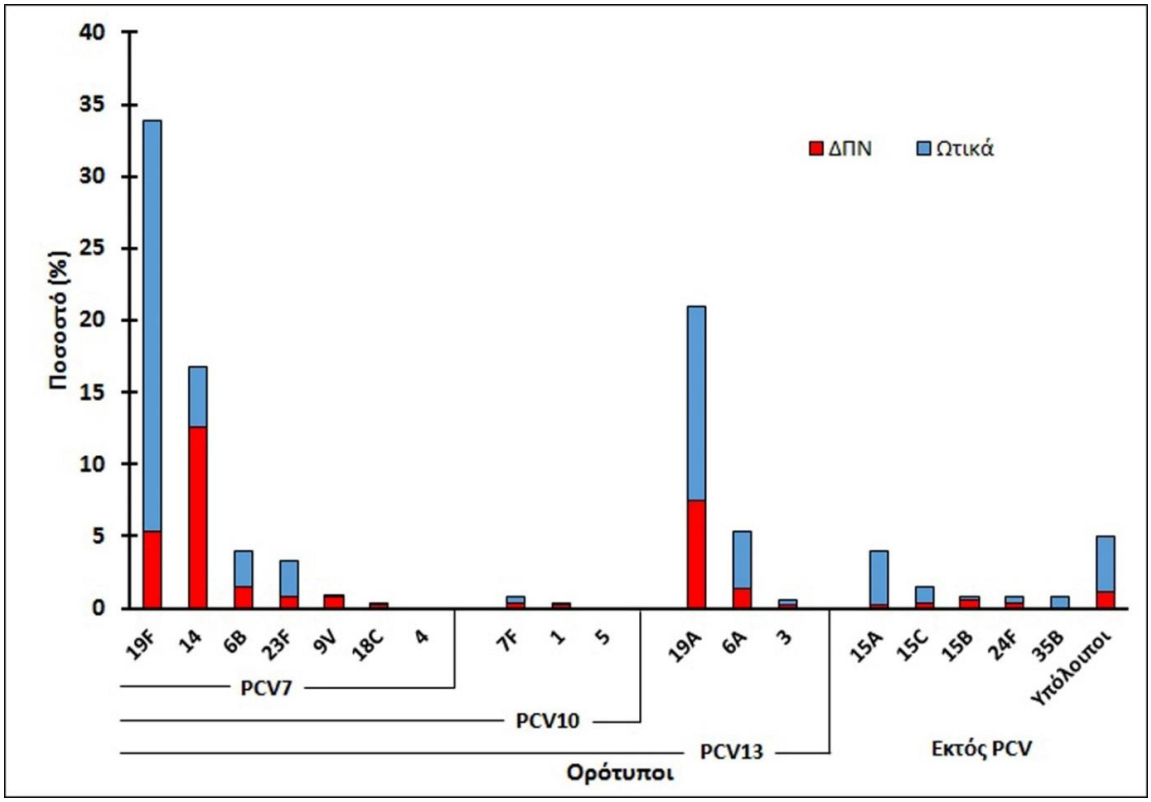
Σχήμα 18. Εξέλιξη της αντοχής του πνευμονιοκόκκου σε ≥3 ομάδες αντιβιοτικών σε στελέχη από ΔΠΝ και από ωτίτιδα ($p < 0,001$).

3.5 Μικροβιακή αντοχή και ορότυποι

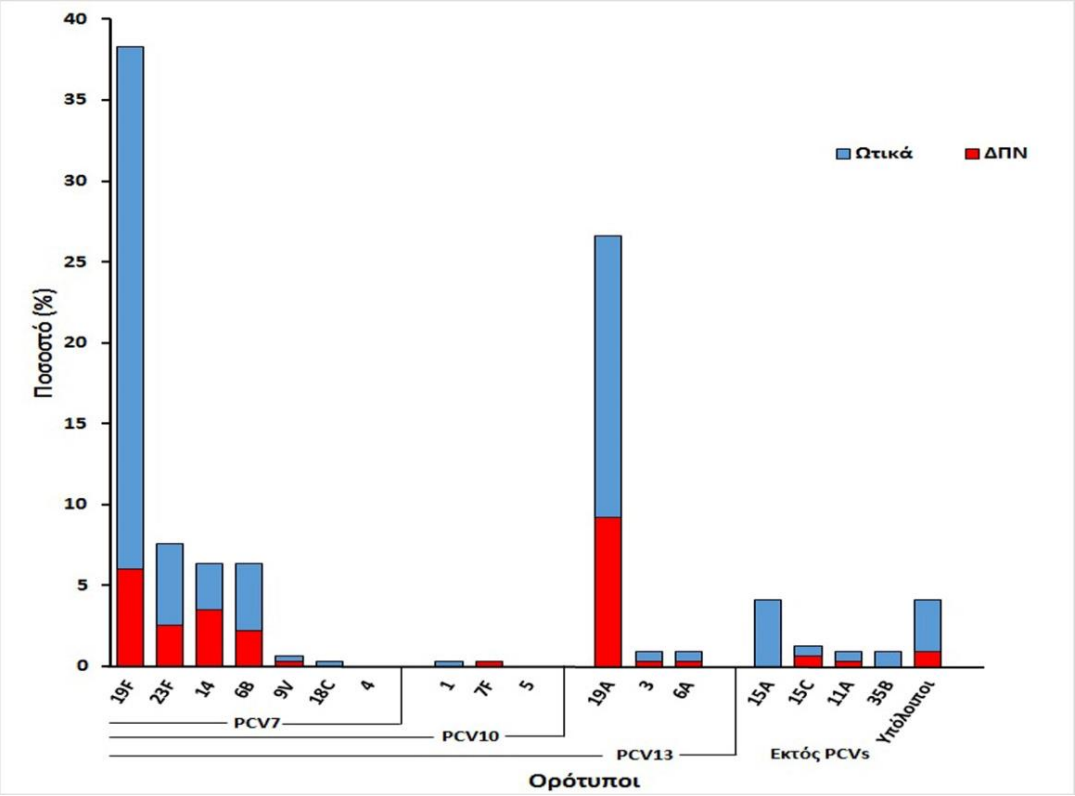
Τα ανθεκτικά στην πενικιλλίνη στελέχη τόσο αυτά από στις ΔΠΝ όσο και από ωτίτιδα ανήκαν κυρίως στους οροτύπους 19F, 19A, 23F, 14 και 9V, ενώ τα ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη εκτός των προαναφερθέντων οροτύπων περιλάμβαναν και τους οροτύπους 6A και 6B (σχήμα 19 και 20). Η κατανομή των οροτύπων σε 316 πολυανθεκτικά στελέχη πνευμονιοκόκκου (αντοχή σε ≥3 ομάδες αντιβιοτικών) απεικονίζεται στο σχήμα 21. Οι πλέον συχνοί ορότυποι στα πολυανθεκτικά στελέχη ήταν οι 19A και 19F.



Σχήμα 19. Κατανομή οροτύπων σε 201 στελέχη πνευμονιοκόκκου ανθεκτικά στην πενικιλλίνη. Οι ορότυποι εκτός PCVs ήταν: 19C, n=3, 11A, 15B, 35B, n= 2 και 15A, 17, 23A, 29, 8, n=1.



Σχήμα 20. Κατανομή οροτύπων σε 525 στελέχη πνευμονιοκόκκου ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη.



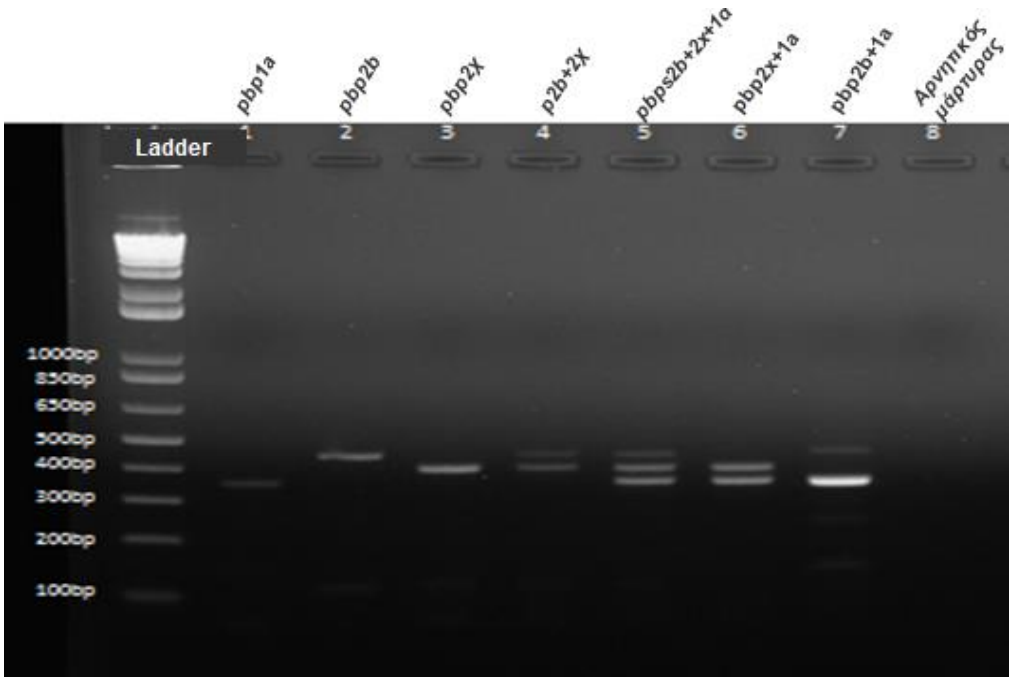
Σχήμα 21. Κατανομή οροτύπων σε 316 πολυανθεκτικά στελέχη πνευμονιοκόκκου (αντοχή σε ≥3 ομάδες αντιβιοτικών).

3.6 Μηχανισμοί αντοχής

Τα τροποποιημένα *pbps* γονίδια που ανιχνεύτηκαν στα μη ευαίσθητα στην πενικιλλίνη στελέχη σε σχέση με το επίπεδο των MICs απεικονίζονται στο πίνακα 13. Ενδεικτικά στην εικόνα 9 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης των προϊόντων PCR για την ανίχνευση των *pbps*. Τα πλέον συχνά τροποποιημένα γονίδια ήταν το *pbp2x* και οι συνδυασμοί, *pbp2x* + *pbp1a και pbp2b* + *pbp2x* + *pbp1a*. Σημειωτέον, ότι υψηλού επιπέδου αντοχή στην πενικιλλίνη (≥ 2 μg/mL), παρατηρήθηκε κυρίως στα στελέχη με τους δύο τελευταίους συνδυασμούς (πίνακας 13). Επιπλέον, διαπιστώθηκε συσχέτιση ορισμένων *pbp*s με συγκεκριμένους οροτύπους π.χ. το γονίδιο *pbp1a* με τους οροτύπους 23B και 6A, το γονίδιο *pbp2x,* οι συνδυασμοί *pbp2b*+ *pbp2x, pbp2x*+ *pbp1a* με τον ορότυπο 19A, και ο συνδυασμός *pbp2b* + *pbp2x* + *pbp1a* με τον ορότυπο 19F ($p < 0,0001$), όπως φαίνεται στον πίνακα 14.

Πίνακας 13. Κατανομή στελεχών μη ευαίσθητων στην πενικιλλίνη σε σχέση με τα τροποποιημένα *pbps* γονίδια και τις MICs των στελεχών

		MIC (μg/mL)			
Μετάλλαξη γονιδίων *pbps*	**Αριθμός στελεχών**	**≤1**	**2**	**4**	**8**
pbp2b	1	1	0	0	0
pbp2b + *pbp1a*	23	20	2	1	0
pbp1a	32	32	0	0	0
pbp2b + *pbp2x*	24	14	9	1	0
pbp2x	136	130	5	1	0
pbp2x + *pbp1a*	105	56	27	17	5
pbp2b + *pbp2x* + *pbp1a*	251	118	101	28	4
Σύνολο στελεχών	**572**	**371**	**144**	**48**	**9**

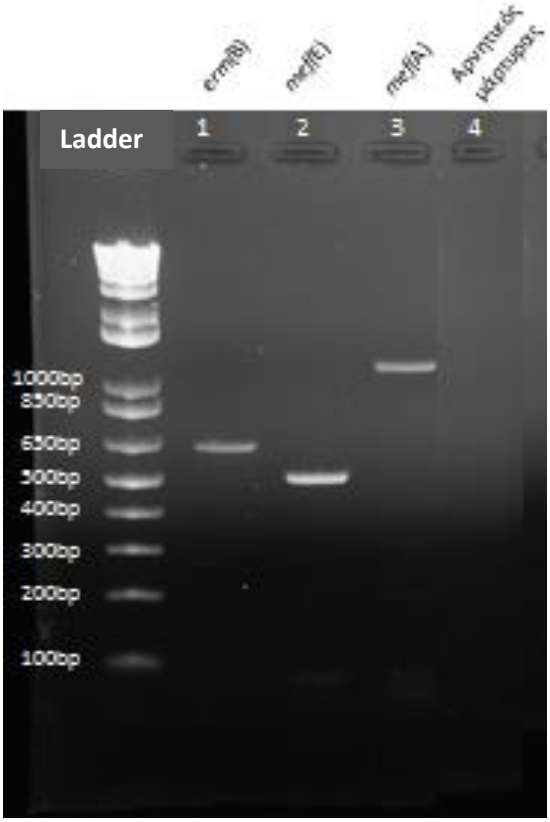


Εικόνα 9. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% των προϊόντων PCR στελεχών πνευμονιοκόκου ανθεκτικών στην πενικιλλίνη για την ανίχνευση των γονιδίων *pbp1a, pbp2b, pbp2x, pbp2x + pbp1a* και *pbp2b + pbp2x + pbp1a.* Ladder: κλίμακα διαβάθμισης του μεγέθους του DNA. Στήλη 1: στέλεχος που περιέχει το γονίδιο *pbp*1a. Στήλη 2: στέλεχος που περιέχει το γονίδιο *pbp2b*. Στήλη 3: στέλεχος που περιέχει το γονίδιο *pbp2x*. Στήλη 4: στέλεχος που περιέχει τα γονίδια *pbp2b+ pbp2x*. Στήλη 5: στέλεχος που περιέχει τα γονίδια *pbp2b+pbp2x+pbp1a*. Στήλη 6: στέλεχος που περιέχει τα γονίδια *pbp2x+pbp1a*. Στήλη 7: στέλεχος που περιέχει τα γονίδια *pbp2b + pbp1a*. Στήλη 8: αρνητικός μάρτυρας.

Πίνακας 14. Κατανομή οροτύπων ανάλογα με τα τροποποιημένα *pbps* γονίδια σε 572 στελέχη πνευμονιοκόκκου με MIC στην πενικιλλίνη ≥ 0,12 μg/mL

Οροτυπος	***pbp2b***	***pbp1a***	***pbp2x***	***pbp2b + pbp1a***	***pbp2b + pbp2x***	***pbp2x + pbp1a***	***pbp2b + pbp2x + pbp1a***	**Σύνολο N(%)**
19F		5 (15,6)	17 (12,5)	4 (17,4)		22 (21,1)	144 (57,4)	192 (33,6)
19A		3 (9,4)	58 (42,6)		15 (62,5)	60 (57,1)	6 (2,4)	142 (24,9)
23F		3 (9,4)	2 (1,5)	1 (4,3)		3 (2,9)	25 (10.0)	33 (5,8)
14			4 (3,0)	1 (4,3)	2 (8,3)	6 (5,7)	24 (9,5)	37 (6,5)
23B		7 (21,9)	3 (2,2)	2 (8,7)	1 (4,2)			13 (2,3)
9V			3 (2,2)		3 (12,5)		20 (8,0)	26 (4,6)
6B		1 (3,1)	7 (5,1)			1 (0,9)	10 (4,0)	19 (3,3)
6A	1 (100)	7 (21,9)	7 (5,1)	2 (8,7)		4 (3,8)	2 (0,8)	23 (4,0)
15C		3 (9,4)	1 (0,7)	6 (26,2)				10 (1,8)
15B		2 (6,2)	2 (1,5)	2 (8,7)	1 (4,2)		1 (0,4)	8 (1,4)
15A			9 (6,6)			3 (2,9)		12 (2,1)
11A			5 (3,7)	2 (8,7)	1 (4,2)		3 (1,2)	11 (1,9)
Υπόλοιποι		1 (3,1)	18 (13,2)	3 (13.0)	1 (4,2)	6 (5,7)	16 (6,4)	45 (7,9)
Σύνολο	**1**	**32**	**136**	**23**	**24**	**105**	**251**	**572**

Η συχνότητα των γονιδίων που προσδίδουν αντοχή στις μακρολίδες σε 524 στελέχη πνευμονιοκόκκου ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη φαίνεται στον πίνακα 15. Το συχνότερα ανιχνευόμενο γονίδιο ήταν το *mef*(E) σε 218(41,6%) στελέχη, ακολουθούσε το *erm*(B) σε 155 (29.6%), ο συνδυασμός *mef*(E)+*erm*(B) σε 89 (17%) και τέλος το *mef*(A) σε 62 (11.8%). Στην εικόνα 10 απεικονίζονται τα αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης για την ανίχνευση των ως άνω γονίδιων. Επιπλέον, θα πρέπει να σημειωθεί ότι υπήρχε σημαντική συσχέτιση μεταξύ των γονίδιων που προσδίδουν αντοχή στην ερυθρομυκίνη και ορισμένων οροτύπων. Όπως φαίνεται στον πίνακα 16, η πλέον εκσεσημασμένη συσχέτιση ήταν του γονιδίου *mef*(A) με τον ορότυπο 14, (το 93,6% των στελεχών που περιείχαν το *mef*(A) ανήκαν στον ορότυπο 14, $p < 0,0001$). Επίσης, σημαντική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ του γονιδίου *mef*(E) και του οροτύπου 19F και του συνδυασμού των γονιδίων *mef*(E)+*erm*(B) με τον ορότυπο 19A ($p < 0,0001$).



Εικόνα 10. Ηλεκροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% των προϊόντων PCR στελεχών πνευμονιοκοκκόκου ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη για την ανίχνευση των γονιδίων *erm(*B), *mef(*E) και *mef(*A). Ladder: κλίμακα διαβάθμισης του μεγέθους του DNA. Στήλη 1: στέλεχος που περιέχει το γονίδιο *erm(*B). Στήλη 2: στέλεχος που περιέχει το γονίδιο *mef(*E). Στήλη 3: στέλεχος που περιέχει το γονίδιο *mef(*A). Στήλη 4: αρνητικός μάρτυρας.

Πίνακας 15. Συχνότητα γονιδίων που προσδίδουν αντοχή στις μακρολίδες σε 524 στελέχη πνευμονιοκόκκου με αντοχή στην ερυθρομυκίνη.

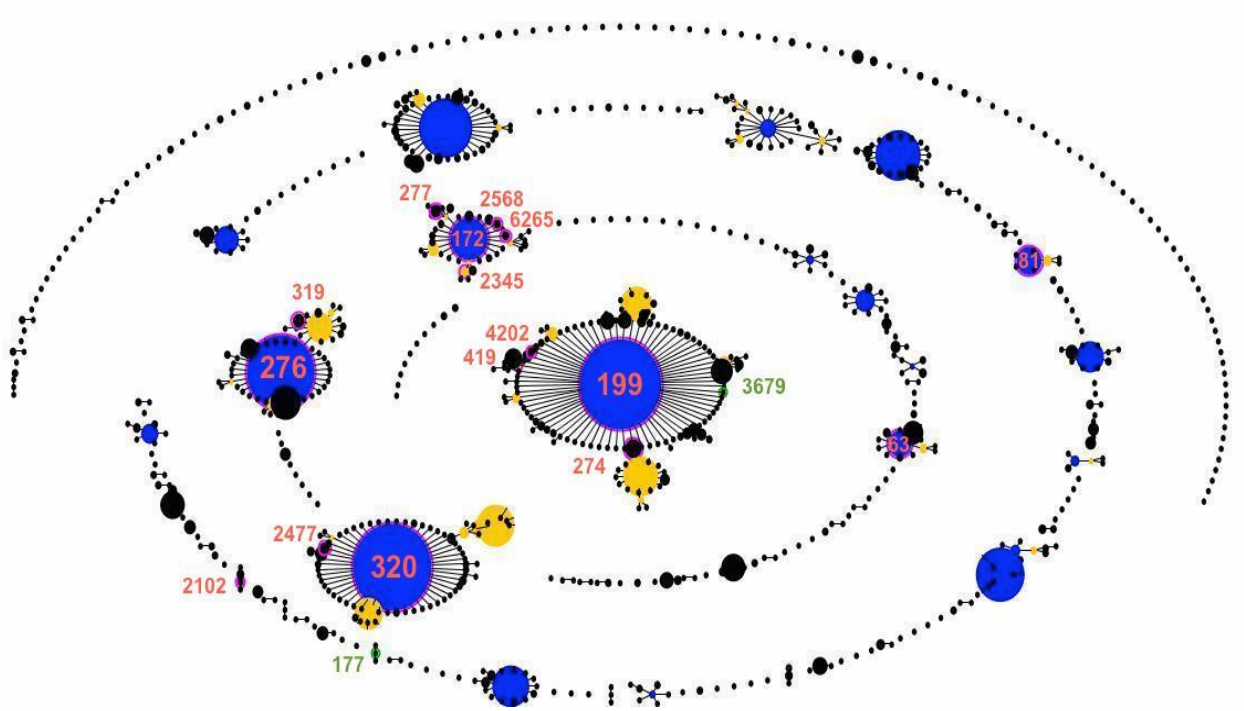
Γονίδιο	Αριθμός στελεχών	Ποσοστό (%)
mef(A)	62	11.8
mef(E)	218	41.6
erm(B)	155	29.6
mef(E) + erm(B)	89	17.0
Σύνολο	524	100

Πίνακας 16. Κατανομή οροτύπων σε 524 στελέχη πνευμονιοκόκκου ανάλογα με τα γονίδια που προσδίδουν αντοχή στην ερυθρομυκίνη.

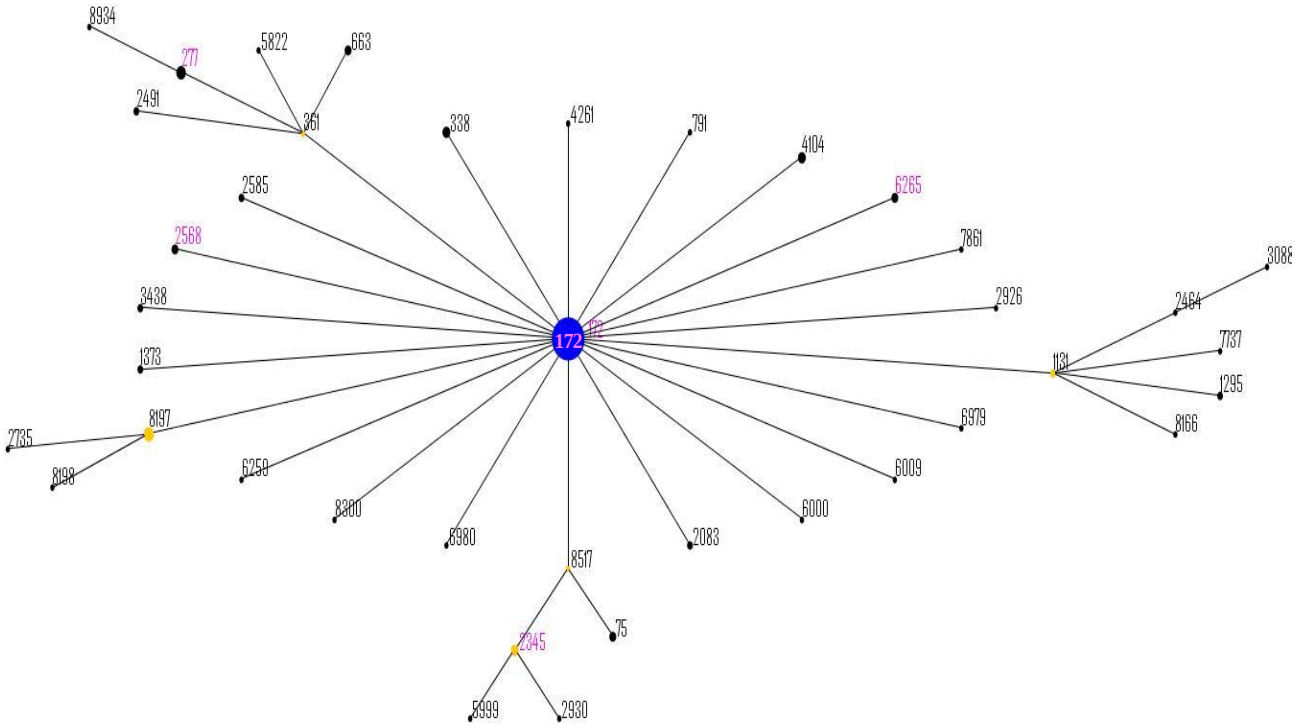
Ορότυπος	*mef*(A)	*mef*(E)	*erm*(B)	*mef*(E)+*erm*(B)	Σύνολο N (%)
19F		134 (61,5)	19 (12,3)	25 (28,1)	178 (34,0)
19A		21 (9,6)	36 (23,2)	53 (59,6)	110 (21,0)
14	58 (93,6)	8 (3,7)	19 (12,3)	3 (3,4)	88 (16,8)
6A	2 (3,2)	24 (11,0)	2 (1,3)		28 (5,3)
6B		4 (1,8)	17 (11,1)		21 (4,0)
23F		3 (1,4)	12 (7,7)	2 (2,2)	17 (3,2)
15A			18 (11,6)	3 (3,4)	21 (4,0)
9V	2 (3,2)	3 (1,4)			5 (0,9)
15C		1 (0,5)	5 (3,2)	1 (1,1)	7 (1,3)
15B		1 (0,5)	3 (1,9)		4 (0,8)
7F		3 (1,4)		1 (1,1)	4 (0,8)
24F		3 (1,4)	1 (0,6)		4 (0,8)
35B		3 (1,4)	1 (0,6)		4 (0,8)
Υπόλοιποι		10 (4,6)	22 (14,2)	1 (1,1)	33 (6,3)
Σύνολο	**62**	**218**	**155**	**89**	**524**

3.7 Κλωνικά συμπλέγματα οροτύπου 19A

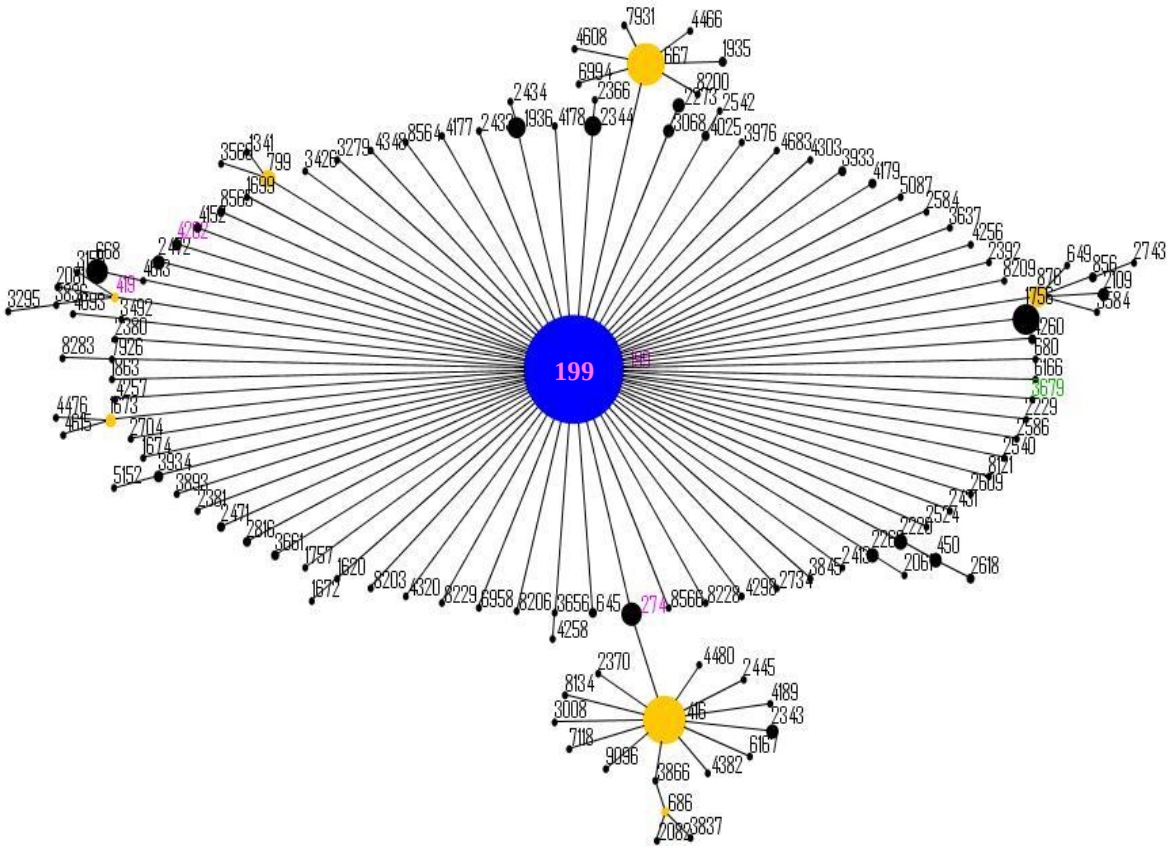
Ο πολυτοπικός προσδιορισμός αλληλουχίας (*Multilocus Sequence Typing*, *MLST*) έγινε σε 31 στελέχη ορότυπου 19A. Τα STs των 27 στελεχών ανήκαν σε 4 κλωνικά συμπλέγματα, clonal complexes (CC), CC172 (n=11), CC199 (n=8), CC320 (n=5), CC276 (n=3) και 4 στελέχη ανήκαν στα CC2669, CC177, CC81, CC63. Το CC172 και CC199 ήταν παρόντα καθ 'όλη τη διάρκεια της μελέτης, ενώ το CC320 και CC276 εμφανίστηκαν μετά το 2009. Τα ως άνω κλωνικά συμπλέγματα και οι συσχετίσεις τους απεικονίζονται στις εικόνες 11-15.



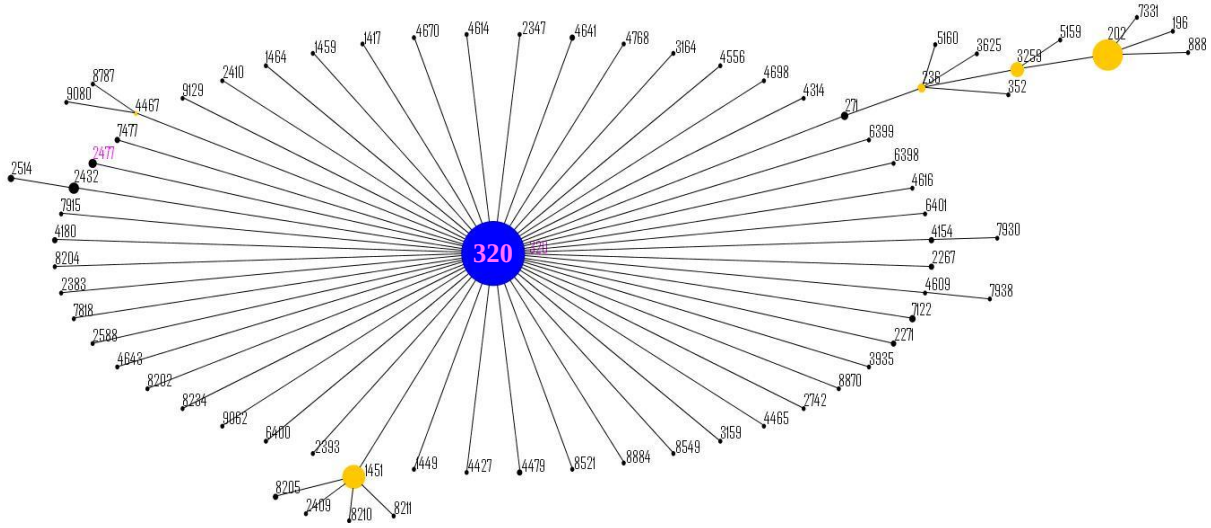
Εικόνα 11. Κλωνικά συμπλέγματα και τα STs στα οποία ανήκαν τα 31 στελέχη ορότυπου 19A της παρούσας μελέτης. Η σύγκριση έγινε με 3329 στελέχη *S. pneumoniae* ορότύπου 19A της βάσης MLST (http://spneumoniae.mlst.net, accessed 31/12/14). Η φυλογενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τον eBURST αλγόριθμο, που διατίθεται στην ιστοσελίδα http://eburst.mlst.net.



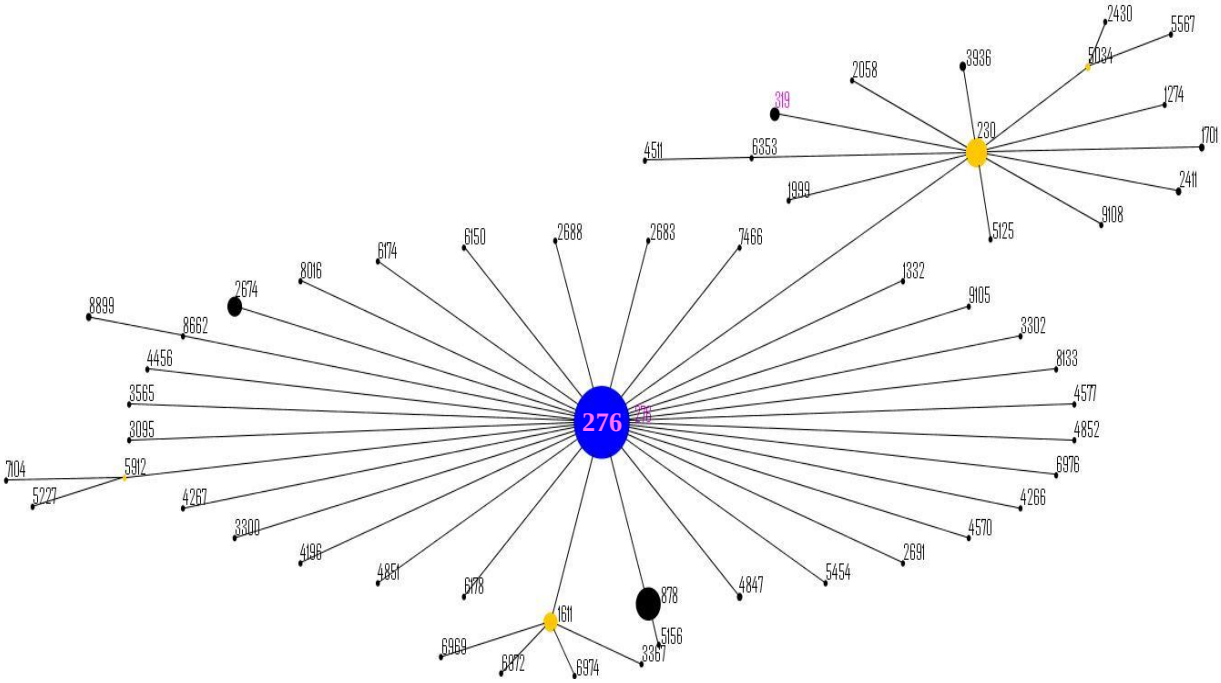
Εικόνα 12. Κλωνικό συμπλέγμα 172. Με ροζ χρώμα επισημαίνονται τα STs στα οποία ανήκαν 11στελέχη ορότύπου 19A της παρούσας μελέτης. Η φυλογενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τον eBURST αλγόριθμο, που διατίθεται στην ιστοσελίδα http://eburst.mlst.net.



Εικόνα 13. Κλωνικό συμπλέγμα 199. Με ροζ χρώμα επισημαίνονται τα STs στα οποία ανήκαν 8 στελέχη οροτύπου 19A της παρούσας μελέτης. Η φυλογενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τον eBURST αλγόριθμο, που διατίθεται στην ιστοσελίδα http://eburst.mlst.net.



Εικόνα 14. Κλωνικό συμπλέγμα 320. Με ροζ χρώμα επισημαίνονται τα STs στα οποία ανήκαν 5 στελέχη οροτύπου 19A της παρούσας μελέτης. Η φυλογενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τον eBURST αλγόριθμο, που διατίθεται στην ιστοσελίδα http://eburst.mlst.net.



Εικόνα 15. Κλωνικό σύμπλεγμα 276. Με ροζ χρώμα επισημαίνονται τα STs στα οποία ανήκαν 3 στελέχη οροτύπου 19A της παρούσας μελέτης. Η φυλογενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τον eBURST αλγόριθμο, που διατίθεται στην ιστοσελίδα http://eburst.mlst.net.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα έρευνα εξετάζει διαχρονικά (1986-2015) την επιδημιολογία των πνευμονιο-κοκκικών λοιμώξεων. Τα χαρακτηριστικά των στελεχών του πνευμονιοκόκκου που τις προκαλούν και την εξέλιξη της πνευμονιοκοκκικής νόσου στα βρέφη και παιδιά στην περιοχή της Αττικής, πριν από και μετά την εφαρμογή των PCVs. Τα αποτελέσματα της μελέτης δίδουν σημαντικές πληροφορίες για την χάραξη στρατηγικής στην αντιμετώπιση και πρόληψη των πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων.

Από τα 1875 παιδιά που περιελήφθησαν στη μελέτη, οι διεισδυτικές λοιμώξεις αποτελούσαν περίπου το ήμισυ των λοιμώξεων και οι υπόλοιπες αφορούσαν ωτίτιδες. Το υψηλό ποσοστό των ΔΠΝ εξηγείται από το γεγονός ότι μελετήθηκαν κυρίως νοσηλευόμενα παιδιά και μικρότερο ποσοστό παιδιών από τα εξωτερικά ιατρεία που έπασχαν κυρίως από ΜΠΩ. Η πιο συχνή λοίμωξη ήταν η πνευμονία, και ακολουθούσαν με σειρά συχνότητας η πρωτοπαθής βακτηριαιμία, η μηνιγγίτιδα και η μαστοειδίτιδα. Επί του συνόλου των λοιμώξεων η πνευμονιοκοκκική νόσος ήταν πιο συχνή στα αγόρια κατά 1,2 φορές και σε παιδιά ηλικίας κάτω των δύο ετών. Παρόμοιες παρατηρήσεις έχουν γίνει και σε άλλες χώρες, όπως στη Δανία (Nielsen και Henrichsen, 1996, Kaltoft και συν., 2000), στο Ηνωμένο Βασίλειο (Sleeman και συν., 2001), και στη Νορβηγία (Pedersen και συν., 2004), στις οποίες διαπιστώθηκε υψηλότερος κίνδυνος νόσησης στα αγόρια σε σχέση με τα κορίτσια και η διαφορά αυτή ήταν πιο εμφανής στα άκρα των ηλικιών, σε παιδιά < 5 ετών και στους ηλικιωμένους (Konradsen και Kaltoft, 2002, Pelton και Jacobs, 2014).

Επιπλέον η νόσος εμφάνισε εποχική κατανομή με αυξημένη συχνότητα κατά τους χειμερινούς μήνες σε σχέση με τους θερινούς. Όπως έχει προταθεί και από άλλους ερευνητές και σε παλαιότερη μελέτη μας, η συχνότερη εμφάνιση πνευμονιοκοκκικής νόσου παρατηρείται κατά τους χειμερινούς μήνες, στο Βόρειο Ημισφαίριο, (Dowell και συν., 2003, Pelton και Jacobs, 2014, Syriopoulou και συν., 2000). Αυτό πιθανόν να οφείλεται στην αυξημένη επίπτωση των ιογενών λοιμώξεων που προδιαθέτουν σε αποικισμό και λοίμωξη, καθώς και στην αυξημένη μετάδοση του μικροβίου λόγω συγχρωτισμού κατά τους χειμερινούς μήνες (Dagan και συν., 1996, Gray και συν., 1982, Pelton και Jacobs, 2014).

Περισσότερα από τα 2/3 των λοιμώξεων προκλήθηκαν από 12 οροτύπους. Αξίζει να σημειωθεί ότι το 67,8% των ΔΠΝ και 65,4% των ΜΠΩ πριν την εφαρμογή των PCVs, προκλήθηκαν από οροτύπους που περιλαμβάνονται στο PCV7. Τα αποτελέσματα αυτά

συμφωνούν με άλλων χωρών της Ευρώπης και της Αφρικής, όπου τα ποσοστά των οροτύπων που προκαλούν ΔΠΝ και καλύπτονται από το PCV7 κυμαίνονται μεταξύ 70-75% (Feikin και συν., 2002, Hausdorff και συν., 2000b, Hausdorff και συν., 2005, Isaacman και συν., 2010), ενώ είναι μικρότερα από αυτά των ΗΠΑ, του Καναδά και της Αυστραλίας που φθάνουν το 80-90%, και υψηλότερα από τα ποσοστά που παρατηρούνται στη Λατινική Αμερική ~65% και την Ασία 30-50%, όπου οι ορότυποι 1, 3, 5, και 7F, κυρίως ευθύνονταν για τις ΔΠΝ πριν από την κυκλοφορία του PCV7 (Hausdorff και συν., 2000a, Hausdorff και συν., 2005).

Όσον αφορά το PCV10 και PCV13 διαπιστώσαμε υψηλά ποσοστά κάλυψης, που ήταν για την πριν από PCVs χρονική περίοδο 92,7% για τις ΔΠΝ και 87,4% για την ΜΠΩ. Σε άλλες χώρες της Ευρώπης η κάλυψη του PCV10 πριν από την εφαρμογή του εμβολίου κυμάνθηκε από 67% έως 93% και για το PCV13 από 56% έως 95%, παρέχοντας κατά μέσο όρο πρόσθετη κάλυψη σε σχέση με το PCV7, 7% και 16%, αντίστοιχα, για παιδιά <2 ετών (Isaacman και συν., 2010).

Στη χώρα μας το PCV7 άρχισε να χρησιμοποιείται τον Ιανουάριο του 2006 με 75% αποζημίωση μετά τον Ιούνιο του ιδίου έτους. Στη συνέχεια, κυκλοφόρησε το PCV10, το 2009, και το PCV13 το 2010. Σημαντική, >90%, εμβολιαστική κάλυψη των παιδιών ≤ 5 ετών σημειώθηκε μετά την πλήρη αποζημίωση του PCV7, το 2008. Η εφαρμογή των συζευγμένων εμβολίων είχε σημαντική επίδραση στην αλλαγή της επιδημιολογίας της πνευμονιοκοκκικής νόσου. Πράγματι, στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε σημαντική ελάττωση των ΔΠΝ από 12,3 περιπτώσεις/1000 εισαγωγές το 2005, πριν από την εφαρμογή των PCVs σε 0,4 περιπτώσεις /1000 εισαγωγές το 2015, δέκα έτη μετά την εφαρμογή των εν λόγω εμβολίων.

Η εφαρμογή του PCV7 είχε σημαντική επίδραση στην ελάττωση της ΔΠΝ σε όλες τις χώρες που εφαρμόστηκε, εντούτοις οι μεταβολές που παρατηρήθηκαν στην επίπτωση της νόσου ποίκιλλαν μεταξύ των διαφόρων πληθυσμών, ανάλογα με τα ποσοστά κατανομής των οροτύπων του εμβολίου και την εμβολιαστική κάλυψη του πληθυσμού σε κάθε περιοχή (Barricarte και συν., 2007, Deceuninck, και συν., 2010, Domınguez και συν., 2011, Kellner και συν., 2009, Klugman και συν., 2008, Lehmann και συν., 2010, Pilishvili, και συν., 2010, Ruckinger και συν., 2010, Whitney και συν., 2003). Για παράδειγμα, στις ΗΠΑ πριν από την εισαγωγή του PCV7, όπου οι ορότυποι του εμβολίου ήταν υπεύθυνοι για την πλειοψηφία των ΔΠΝ περιπτώσεων, η συχνότητα εμφάνισης των ΔΠΝ μειώθηκε δραματικά στα παιδιά <5 ετών, για μεν τους οροτύπους του εμβολίου κατά 94%, ενώ για όλους τους οροτύπους κατά 75%. Επίσης παρατηρήθηκε μείωση και στους ενήλικες μετά την εισαγωγή του PCV7, λόγω

συλλογικής ανοσίας (Black και συν., 2002b, CDC 2008, Miller και συν., 2011a, Whitney και συν., 2003).

Σε άλλες χώρες, όπου οι ορότυποι του PCV7 είχαν υψηλή επίπτωση στα παιδιά πριν από την εφαρμογή του εμβολίου, όπως στον Καναδά σε παιδιά ≤23 μηνών παρατηρήθηκε μείωση κατά 92.6% για τους οροτύπους του εμβολίου και κατά 81.6% για όλους τους οροτύπους (Center, 2007, Kellner και συν., 2009, Lehmann και συν., 2010), ενώ σε άλλες γεωγραφικές περιοχές, όπως στην Ευρώπη η ελάττωση της νόσου διέφερε ανά χώρα (Dominguez και συν., 2011, Hanquet και συν., 2011, Ruckinger και συν., 2010, Vestrheim και συν., 2008). Στη Γαλλία το 2005, σε παιδιά <2 ετών σημειώθηκε μείωση 39% για τη μηνιγγίτιδα και 28% για τη βακτηριαιμία. Στην Ισπανία επίσης το 2003, σε παιδιά <2 ετών για τις ΔΠΝ σημειώθηκε ελάττωση 39%, ενώ στη Γερμανία, το 2008, σε παιδία < 2 ετών, παρατηρήθηκε μείωση 50% και λίγο χαμηλότερη μείωση σε παιδιά 24-59 μηνών (Center, 2007, Isaacman και συν., 2010).

Πρόσφατα στοιχεία επιβεβαιώνουν ότι το PCV13 παρουσιάζει υψηλή αποτελεσματικότητα στην πρόληψη της ΔΠΝ. Στο Ηνωμένο Βασίλειο ο Andrews και συν. το 2014 αναφέρουν αποτελεσματικότητα του PCV13 στο 75% μετά από δύο δόσεις πριν από την ηλικία των 12 μηνών ή μία δόση μετά από 12 μήνες. Επίσης η αποτελεσματικότητα του εμβολίου ήταν 90% (εύρος 34-98) για τους ορότυπους του PCV7 και 73% (εύρος 55-84) για τους έξι επιπλέον ορότυπους που περιλαμβάνονται στο PCV13. Μια μελέτη που διεξήχθη σε ιθαγενείς της Αλάσκας σε παιδιά ηλικίας κάτω των 5 ετών αναφέρει μείωση στην επίπτωση τις ΔΠΝ πολύ ενωρίς (1-2 χρόνια) μετά από την εισαγωγή του εμβολίου (Singleton και συν., 2013). Τα δεδομένα αυτά ήταν σύμφωνα με δεδομένα των ΗΠΑ όπου παρατηρήθηκε μείωση των εισαγωγών στο νοσοκομείο για πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις σε παιδιά μικρότερα από 5 ετών, καθώς και σε ενηλίκους, μετά την εισαγωγή του PCV13 (Simonsen και συν., 2014).

Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρονται από τη Μαδρίτη και το Ηνωμένο Βασίλειο, όπου δύο μελέτες έδειξαν μείωση της επίπτωσης της ΔΠΝ στα παιδιά μετά την αλλαγή στο πρόγραμμα εμβολιασμού της παιδικής ηλικίας από PCV7 σε PCV13 (Picazo και συν., 2013, Moore και συν., 2014). Τέλος, σε μία μελέτη από τη Δανία αναφέρεται σημαντική μείωση στη συχνότητα της ΔΠΝ, ιδιαίτερα σε παιδιά μικρότερα των 2 ετών, σε σύντομο χρονικό διάστημα μετά την αλλαγή του Εθνικού προγράμματος εμβολιασμού από PCV7 στο PCV13. Η μείωση της νόσου συνοδεύτηκε και από μείωση της θνητότητας σε παγκόσμια κλίμακα (Harboe και συν., 2014). Αξίζει να σημειωθεί ότι τα PCVs έδειξαν σημαντική αποτελεσμα-

τικότητα στην πρόληψη της πνευμονίας. Το PCV7 έδειξε 27% μείωση της πνευμονίας των παιδιών (Lucero και συν., 2009) και το PCV13 ελάττωσε την πνευμονία της κοινότητας (Community-Acquired Pneumonia Immunization Trial in Adults, CAPiTA) κατά 45% σε ενήλικες ≥ 65 ετών (Bonten και συν., 2015).

Όσον αφορά τη μηνιγγίτιδα στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε ελάττωση της επίπτωσης της νόσου πριν από την εφαρμογή των PCVs, αλλά μετά την χρήση των PCVs η μείωση ήταν πιο εκσεσημασμένη. Παρομοίως, στις ΗΠΑ, η επίπτωση της πνευμονιο-κοκκικής μηνιγγίτιδας μειώθηκε σε όλες τις ηλικιακές ομάδες από οροτύπους που περιλαμβάνονται στο PCV7 αλλά αυξήθηκε σε όλες τις ηλικιακές ομάδες, από οροτύπους που δεν περιλαμβάνονται στο εν λόγω εμβόλιο (Pilishvili, και συν., 2010). Τα ευρήματα είναι σύμφωνα με άλλων μελετών που έχουν δημοσιευθεί στο παρελθόν και τεκμηριώνουν μείωση της μηνιγγίτιδας (Hsu και συν., 2010). Ανάλογα αποτελέσματα περιγράφονται στην Αγγλία και Ουαλία, όπου η επίπτωση της πνευμονιοκοκκικής μηνιγγίτιδας μειώθηκε σχεδόν κατά το ήμισυ στα παιδιά μικρότερα των 5 ετών (Miller και συν., 2011b). Αντίθετα, στη Γαλλία ο εμβολιασμός δεν είχε επίδραση στη μείωση των περιπτώσεων πνευμονιοκοκκικής μηνιγγίτιδας σε παιδιά > 2 ετών, αν και έδειξε καλό αποτέλεσμα σε άτομα μικρότερα των δύο ετών (Levy και συν., 2011). Περαιτέρω μείωση της πνευμονιοκοκκικής μηνιγγίτιδας παρατηρήθηκε μετά την εφαρμογή του PCV13 και αυτό οφειλόταν κυρίως στη μείωση της νόσου από τους οροτύπους 1 και 19A (Levy και συν., 2014, Picazo και συν., 2013).

Από μελέτες των PCVs διαπιστώνεται μικρότερη αποτελεσματικότητα των εν λόγω εμβολίων στην ΜΠΩ σε σχέση με τις ΔΠΝ. Πιο συγκεκριμένα, σε μια φινλανδική τυχαιοποιημένη κλινική μελέτη, αναφέρθηκε ότι ο εμβολιασμός με PCV7 ελάττωσε γενικώς τα επεισόδια της ΜΠΩ κατά 6%, ενώ από οροτύπους που περιέχονται στο εμβόλιο κατά 57% και η συνολική μείωση από οποιοδήποτε ορότυπο του πνευμονιοκόκκου ήταν 34% (Eskola και συν., 2001). Μελέτες από τις ΗΠΑ αναφέρουν μείωση της ΜΠΩ κατά 39% (McEllistrem και συν., 2005), ενώ ο Zhou και συν. έδειξαν ότι ο εμβολιασμός με PCV7 ελάττωσε κατά 40% τις επισκέψεις στο γιατρό των παιδιών για ΜΠΩ και την συνταγογράφηση των αντιβιοτικών (Zhou και συν., 2008).

Επίσης από άλλους ερευνητές αναφέρεται αντικατάσταση οροτύπων και έλλειψη αποτελεσματικότητας σε επαναλαμβανόμενες ΜΠΩ (Jokinen και συν., 2012). Σημειώνεται επίσης ότι σημαντικό ποσοστό των ΜΠΩ είναι μικτές λοιμώξεις που περιλαμβάνουν *S. pneumoniae* και μη-τυποποιήσιμο *Haemophilus influenzae* (NTHi) ως κύρια παθογόνα αίτια

και πιθανόν η ευρεία χρήση του 10-δυνάμου εμβολίου, το οποίο είναι συζευγμένο με την πρωτεΐνη D του NTHί να επιτύχει περαιτέρω προστασία κατά της συλλοίμωξης (Palmu και συν., 2013). Ο Shea και συν. έδειξαν μείωση 12% του αριθμού των επεισοδίων ΜΠΩ από πνευμονιόκοκκο σε παιδιά κάτω των 3 ετών και θεώρησαν ότι οφείλονταν σε συνδυασμένη επίδραση της αποτελεσματικότητας του PCV7 και από την αντικατάσταση οροτύπων που προκάλεσε. Όσον αφορά το PCV13 οι ίδιοι συγγραφείς αναφέρουν επιπλέον μείωση των επεισοδίων ΜΠΩ σε 27% από το 2007 έως το 2013 (Shea και συν., 2011). Πιο πρόσφατες μελέτες από το Ηνωμένο Βασίλειο, τη Γαλλία και το Ισραήλ δείχνουν σημαντική μείωση του αποικισμού από τα στελέχη του εμβολίου και μείωση της ΜΠΩ (Ben-Shimol και συν., 2016, Cohen και συν., 2015, Lau και συν., 2015).

Στην παρούσα μελέτη η ανάλυση χρονολογικών σειρών (interrupted time series analysis, ITSA) ενισχύει την άποψη ότι υπάρχει σχέση αιτίου-αποτελέσματος μεταξύ PCVs και επίπτωσης της ΔΠΝ. Η σχέση αιτίου αποτελέσματος μεταξύ PCVs και πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων ενισχύεται περεταίρω από την παρατηρηθείσα ελάττωση των οροτύπων που καλύπτονται από τα PCVs. Πράγματι τα ποσοστά των οροτύπων που περιλαμβάνονται στο PCV7 ελαττώθηκαν σημαντικά μετά την εφαρμογή του εν λόγω εμβολίου από 67,8% σε 26,4% και 4% για τις ΔΠΝ και από 65,4% σε 35,2% και 9,2% για τις ωτίτιδες τις χρονικές περιόδους 1986-2005, 2006-2010 και 2011-2015 αντίστοιχα. Όσον αφορά το PCV13 τα ποσοστά των οροτύπων του ελαττώθηκαν από 92,7% και 87,4% για τις ΔΠΝ και ωτίτιδες αντίστοιχα για την πρώτη χρονική περίοδο (1986-2005) σε 55,2% και 38,9% την χρονική περίοδο 2011-2015.

Αν και το PCV7 ήταν ιδιαίτερα αποτελεσματικό στη μείωση των περιπτώσεων ΔΠΝ, της ωτίτιδας και του αποικισμού από οροτύπους που περιείχε, στην παρούσα μελέτη προκάλεσε αύξηση παθογόνων οροτύπων εκτός PCV7 όπως των οροτύπων 7F, 19A, και 3, όπως έχει αναφερθεί και σε άλλες ελληνικές (Koutouzis και συν., 2008, Maraki και συν., 2010, Stamboulidis και συν., 2011) και ξένες μελέτες από άλλους ερευνητές (Feikin και συν., 2013, Hausdorff και συν., 2012, Hicks και συν., 2007, Pilishvili και συν., 2010, Yildirim και συν., 2012)

Η πρόληψη του αποικισμού από τα στελέχη του εμβολίου αφήνει πρόσφορο το έδαφος για αποικισμό από οροτύπους που δεν περιλαμβάνονται στα PCVs (αντικατάσταση οροτύπων). Η πρώτη μελέτη που διαπίστωσε αντικατάσταση οροτύπων μετά από εμβολιασμό έγινε στη Γκάμπια σε βρέφη που ανοσοποιήθηκαν με 5-δύναμο συζευγμένο

εμβόλιο, το 1996 (Obaro και συν., 1996). Ακολούθησαν πολλές άλλες τυχαιοποιημένες μελέτες μετά τη χρήση του PCV7 που έδειξαν μείωση των ΔΠΝ και της ΜΠΩ από τους οροτύπους που περιλαμβάνονται στο εμβόλιο και αύξηση κυρίως των οροτύπων: 1, 19A, 3, 6A και 7F (Hsu και συν., 2010, Isaacman και συν., 2010, Leal και συν., 2012, Rodgers και συν., 2009).

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι μετά τη χρήση του PCV7 στην παρούσα μελέτη, η αύξηση του οροτύπου 19A αποτέλεσε την πιο σημαντική αιτία ΔΠΝ και ωτίτιδας. Παρομοίως, στις ΗΠΑ ο ορότυπος 19A ήταν η σημαντικότερη αιτία ΔΠΝ σε όλες τις ηλικιακές ομάδες μετά την εισαγωγή του PCV7 (Pilishvili και συν., 2010). Επιπλέον, άλλες μελέτες έχουν συσχετίσει την εμφάνιση του οροτύπου 19A, ως κυρίου αιτίου μαστοειδίτιδας και ΜΠΩ μετά την εισαγωγή του PCV7 (Giannakopoulos και συν., 2014, Hsu και συν., 2010, Isaacman και συν., 2010, Koutouzis και συν., 2016, Pilishvili 2010).

Μετά την εφαρμογή του PCV13 παρατηρήσαμε σημαντική μείωση του 7F ενώ οι ορότυποι 19A και 3 εμφανίζουν τάση πτώσης. Σε αντίθεση με τη μελέτη μας, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει σημαντική ελάττωση όχι μόνο του 7F, αλλά και των οροτύπων 19A και 3 (Farnham και συν., 2015). Η βραδεία πτώση του οροτύπων στη μελέτη μας πιθανόν να οφείλεται στη μη επιθυμητή, μέχρι τώρα, εμβολιαστική κάλυψη με PCV13 του παιδικού πληθυσμού της χώρας μας. Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι μετά την εφαρμογή των PCVs ακολούθησε στην περιοχή μας αύξηση των οροτύπων: 11A, 23B, 10A, 15A, 15C, 23A, 15B, 24F, 22F και 6C. Ανάλογες παρατηρήσεις με ανάδυση οροτύπων που δεν περιέχονται στα PCVs έχουν γίνει από πολλούς άλλους ερευνητές (Hsu και συν., 2010, Isaacman και συν., 2010, Leal και συν., 2012, Weil-Olivier και συν., 2012). Οι αναδυθέντες ορότυποι παρουσιάζουν μικρές διαφορές ως προς το είδος και τη συχνότητα εμφάνισης τις περισσότερες γεωγραφικές περιοχές, πολλοί δε από αυτούς επελέγησαν να συμπεριληφθούν στο νέο 20-δύναμο συζευγμένο εμβόλιο, το οποίο θα είναι διαθέσιμο περίπου σε τρία έτη.

Στη παρούσα μελέτη από τα παιδιά που νόσησαν μόνο το 26,8% είχε λάβει ≥3 δόσεις και το 48,9% είχε λάβει τουλάχιστον μία δόση PCV. Αξίζει να σημειωθεί ότι από τα 205 παιδιά που είχαν εμβολιασθεί με ≥3 δόσεις του PCV7, PCV10 ή PCV13 μόνο το 9,2% νόσησε από ορότυπο που περιλαμβάνονταν στα ως άνω εμβόλια (19F, 23F, 19A, 3, 6A) και από αυτά μόνο το 2,4% εκδήλωσε ΔΠΝ, ενώ τα υπόλοιπα ΜΠΩ. Παρόμοια αποτελέσματα αποτυχίας των PCVs αναφέρονται και από άλλους ερευνητές. Στις ΗΠΑ, ο Park και συν. ανέφεραν 4% ποσοστό αποτυχίας του PCV7 στην πρόληψη των ΔΠΝ στα παιδιά, στο 31%

των περιπτώσεων με υποκείμενες παθολογικές καταστάσεις (Park και συν., 2010). Στη Γαλλία, ο Godot και συν. ανέφεραν, ότι το 3,2% των παιδιών <5 ετών με ατελή εμβολιασμό με PCV7 ή PCV13 και το 0.6% των πλήρως εμβολιασμένων παιδιών, νόσησε από μηνιγγίτιδα, που θεωρήθηκε αποτυχία του εμβολίου. Ο συχνότερος ορότυπος που απομονώθηκε ήταν ο 19F (30,2%) μεταξύ άλλων τεσσάρων: 19A, 23F, 14, 4 (Godot και συν., 2015). Ο Ladhani και συν. το 2013, στο Ηνωμένο Βασίλειο και στην Ουαλία, ανέφεραν ποσοστό αποτυχίας του PCV7 3,9% για τη μηνιγγίτιδα, με συχνότερους οροτύπους απομόνωσης τους 6B (34%) και 19F(30,2%). Επίσης και άλλοι ερευνητές επισημαίνουν τα μικρά ποσοστά αποτυχίας των PCVs για την πρόληψη της ΔΠΝ, με κύριους υπεύθυνους τους οροτύπους: 3, 19A, 19F και 23F (Antachopoulos και συν., 2014, Harboe και συν., 2013, Kaplan και συν., 2013, Ladhani και συν. το 2013, Syrogiannopoulos και συν., 2016).

Σημειωτέον ότι η αποτελεσματικότητα των PCVs είναι υψηλότερη στις ΔΠΝ και υπολείπεται στις βλεννογονικές λοιμώξεις. Οι πιο συχνοί ορότυποι για τις αποτυχίες είναι: 19F, 23F, 19A, 3 και 6A, όπως αναφέρεται και από πολλούς ερευνητές (Cohen και συν., 2015, Couloigner και συν., 2012, Fletcher και Fritzell, 2007, Lau και συν., 2015, McEllistrem και συν., 2005, Shea και συν., 2011). Αυτό εικάζεται ότι οφείλεται στη μεγαλύτερη συγκέ-ντρωση αντισωμάτων που απαιτείται για την πρόληψη της ωτίτιδας, όπως έχει επισημανθεί από άλλους ερευνητές (Frenck και συν., 2011, Vanderkooi και συν., 2012, WHO 2005).

Στη παρούσα μελέτη σημειώθηκε σημαντική αύξηση της αντοχής στην πενικιλλίνη, κεφοταξίμη, ερυθρομυκίνη, κλινδαμυκίνη, τετρακυκλίνη και κοτριμοξαζόλη μετά το 1995, η οποία αυξήθηκε περεταίρω κατά τις περιόδους 2006-2010 και 2011-2015 σε σχέση με την περίοδο 1986-2005, ενώ η αντοχή στη χλωραμφενικόλη ελαττώθηκε κατά 2,5 φορές.

Μετά την αρχική ανίχνευση των μη ευαίσθητων στην πενικιλλίνη στελεχών *S. pneumoniae* σε λίγες γεωγραφικές περιοχές (π.χ., Νότια Αφρική, Αυστραλία, Ισπανία) στη δεκαετία του 1970, η αντοχή στην πενικιλλίνη επεκτάθηκε ραγδαία σε όλο τον κόσμο (Lynch και Zhanel, 2009). Πριν από την εισαγωγή του PCV7, σε ορισμένες περιοχές όπως την Ασία, τη Γαλλία και την Ισπανία, ο ρυθμός αύξησης των μη ευαίσθητων στην πενικιλλίνη στελεχών πνευμονιοκόκκου ήταν μεγαλύτερος από 50% (Lynch και Zhanel, 2009). Τα στελέχη αυτά αντιστοιχούσαν κατά κύριο λόγο σε οροτύπους που περιλαμβάνονται στο PCV7. Μετά την εισαγωγή του PCV7, μελέτες που έχουν διεξαχθεί σε διάφορες χώρες ανέφεραν μείωση στην συχνότητα των ανθεκτικών στην πενικιλλίνη στελεχών και ταυτόχρονα αύξηση της αντοχής σε στελέχη που ανήκαν σε οροτύπους εκτός PCV7 (Richter

και συν., 2009, Fenoll και συν., 2011). Σε δεδομένα από διάφορες περιοχές των ΗΠΑ κατά τη διάρκεια του 2007-2008, οι ορότυποι που περιλαμβάνονται στο PCV13 αποτελούσαν το 78-97% των μη ευαίσθητων στην πενικιλλίνη στελεχών ανάλογα με την ηλικία (Kaplan και συν., 2004). Στην παρούσα μελέτη παρομοίως με άλλες, διαπιστώθηκε ότι οι ορότυποι 19A και 19F κατ εξοχήν συσχετίζονταν με μικροβιακή αντοχή και μάλιστα όχι μόνο σε ένα αντιβιοτικό, αλλά σε ≥ 3 ομάδες αντιβιοτικών, δηλαδή ήταν πολυανθεκτικοί (Muñoz-Almagro και συν., 2009, Moore και συν., 2008, Dagan και Klugman, 2008).

Η εισαγωγή του PCV13 θεωρήθηκε σημαντικό μέσο για την καταπολέμηση του παγκόσμιου προβλήματος της μικροβιακής αντοχής. Πράγματι η άμεση μείωση των ΔΠΝ από ανθεκτικά στα αντιβιοτικά στελέχη στα εμβολιασμένα άτομα σε σχέση με μη εμβολιασθέντες μάρτυρες καταδείχθηκε σε διπλή τυφλή κλινική μελέτη με εννέα-δύναμο συζευγμένο εμβόλιο στη Νότια Αφρική (Klugman και συν., 2003). Η μετέπειτα ευρεία διάδοση του εμβολιασμού των βρεφών, που αποτελούν την κύρια πηγή αποικισμού και της διάδοσης της νόσου, είχε ως αποτέλεσμα να μειώσει όχι μόνο τη συχνότητα εμφάνισης των ΔΠΝ, αλλά και το ποσοστό αποικισμού στα εμβολιασμένα άτομα, τουλάχιστον για τους οροτύπους που περιλαμβάνονται στα PCVs. Η μείωση του αποικισμού στα παιδιά είχε ως αποτέλεσμα να μειώσει τις ΔΠΝ σε μη εμβολιασμένα άτομα και ενήλικες (Siira και συν., 2014). Αυτό αρχικά οδήγησε σε δραματική μείωση του επιπολασμού της μικροβιακής αντοχής του πνευμονιοκόκκου σε όλες τις ηλικίες (Kyaw και συν., 2006), πράγμα που δεν παρατηρήθηκε στη μελέτη μας κατά τη περίοδο 2006-2010, πιθανόν λόγω σταδιακής αύξησης του εμβολιαζόμενου πληθυσμού των παιδιών και της γρήγορης εμφάνισης νέων πολυανθεκτικών στελεχών, όπως αυτά του οροτύπου 19A.

Σύμφωνα με δεδομένα άλλων ερευνητών η συνεχής έκθεση του πληθυσμού στα νέα στελέχη εκτός PCVs προκάλεσε νέα άνοδο της αντοχής, έστω και αν ο απόλυτος αριθμός των πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων είχε μειωθεί (Link-Gelles και συν., 2013). Στη Γερμανία, για παράδειγμα η αντοχή στις μακρολίδες για τις ΔΠΝ κορυφώθηκε το 2005 στο 32% των παιδιών και 19% των ενηλίκων και μειώθηκε σε 15% και 13%, αντίστοιχα, το 2008, μόλις 18 μήνες μετά την εφαρμογή του PCV7 (Zuccotti και συν., 2014). Παρόμοιες παρατηρήσεις έγιναν στις ΗΠΑ (Kyaw και συν., 2006). Στη συνέχεια, μετά την εφαρμογή του PCV7 παρατηρήθηκε άνοδος πολυανθεκτικών στελεχών πνευμονιοκόκκου κυρίως λόγω της ανόδου του οροτύπου 19A, που περιέχεται στο PCV13 (Beall και συν., 2011, Link-Gelles και συν., 2013).

Στη μελέτη αυτή, όπως και σε άλλες, επτά ορότυποι (6A, 6B, 9V, 14, 19A, 19F, και 23F) αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο μέρος των κλινικά σημαντικών στελεχών πνευμονιοκόκκου με αντοχή στα αντιβιοτικά. Πέντε από αυτούς τους οροτύπους (6B, 9V, 14, 19F, και 23F) περιλαμβάνονται στο PCV7, και όλοι στο PVC13. Ο ορότυπος 19A δεν καλυπτόταν από το PCV7, είχε ευρεία εξάπλωση και εμφάνισε πολυαντοχή στα αντιβιοτικά (Dagan και συν., 2008, Pai και συν., 2005). Στις ΗΠΑ τα ποσοστά των ανθεκτικών στην πενικιλλίνη και ερυθρομυκίνη στελεχών του οροτύπου 19A από παιδιά < 5 ετών αυξήθηκαν από 63% και 23% αντίστοιχα, το 1998 και το 1999 σε 74% και 46% αντίστοιχα, το 2004 (Tan, 2012). Σημαντική αύξηση της αντοχής του οροτύπου 19A στην πενικιλλίνη και ερυθρομυκίνη από 8.5% και 10.6% αντίστοιχα για την πριν από το PCV7 περίοδο σε 32% και 65.4% αντίστοιχα για την μετά PCVs σημειώθηκε και στην παρούσα έρευνα.

Στη μελέτη μας δεν διαπιστώθηκαν ανθεκτικά στελέχη σε βανκομυκίνη, λινεζολίδη, ριφαμπικίνη και μοξιφλοξασίνη. Σύμφωνα και με άλλους συγγραφείς αντοχή στη βανκομυκίνη δεν έχει περιγραφεί σε στελέχη πνευμονιοκόκκου (Moscoso και συν., 2010, Reynolds 1989, Zhanel και συν., 2003). Σπάνια έχουν περιγραφεί στελέχη με ανοχή (tolerant) στη βανκομυκίνη, δηλαδή στελέχη ικανά να επιβιώνουν, αλλά να μην πολλαπλασιάζονται παρουσία του αντιβιοτικού (Gillis, 2005, Moscoso και συν., 2010, Novak και συν., 1999, Ortega και συν., 2003). Όσον αφορά την αντοχή στην λινεζολίδη έχει περιγράψει ελάχιστος αριθμός στελεχών με μειωμένη ευαισθησία. Τα στελέχη αυτά βρέθηκαν να περιέχουν απώλεια (deletions) 6-pb στο γονίδιο που κωδικοποιεί τη ριβοσωμική πρωτεΐνη L4 (Wolter και συν., 2005) ή μεταλλάξεις και διαγραφές στο γονίδιο *rpl*D (Dong και συν., 2014).

Παρόλο που δεν διαπιστώσαμε στα στελέχη που μελετήσαμε αντοχή στην ριφαμπικίνη, εντούτοις έχει περιγραφεί από άλλους ερευνητές μικρό ποσοστό ανθεκτικών στελεχών που κυμαίνεται από 0,1% έως 1,5% (Ferrandiz και συν., 2005). Επίσης δεν διαπιστώσαμε ανθεκτικά στελέχη στις κινολόνες σε αντίθεση με άλλες μελέτες επιτήρησης στις ΗΠΑ που έδειξαν ότι τουλάχιστον 1% των στελεχών πνευμονιοκόκκου ήταν ανθεκτικά στις λεβοφλοξασίνη, μοξιφλοξασίνη ή γεμιφλοξασίνη (Jones και συν., 2010). Επίσης, στον Καναδά πρόσφατα παρατηρήθηκε αύξηση της αντοχής στις φθοριοκινολόνες, μετά τη χρήση του PCV7, σε στελέχη που ανήκαν στους οροτύπους: 19A, 35B και 11A (Patel και συν., 2011). Τέλος στην Κροατία και το Χονγκ Κονγκ, 4-13% των στελεχών του πνευμονιόκοκκου έχουν αναφερθεί ανθεκτικά στις φθοριοκινολόνες, ενώ στην Ασία το 2009 και το 2010 σε μια

μελέτη βρέθηκε ποσοστό μέχρι 4% με αντοχή στις νεότερες φθοριοκινολόνες (Wang και συν., 2011). Στις χώρες που αναφέρεται αντοχή στις φθοριοκινολόνες παρατηρείται σε στελέχη που απομονώνονται από ηλικιωμένα άτομα και σε ασθενείς με χρόνια πνευμονοπάθεια που συχνά θεραπεύονται με φθοριοκινολόνες (Ho και συν., 2001). Το γεγονός αυτό δικαιολογεί την απουσία αντοχής στις κινολόνες στα στελέχη που εξετάσαμε

Ο φόβος για παγκόσμια αύξηση της αντοχής του πνευμονιοκόκκου στις φθοριοκινολόνες, όπως συνέβη με τις μακρολίδες, δεν φαίνεται να γίνεται πραγματικότητα σύντομα, γιατί οι κινολόνες δεν χρησιμοποιούνται συχνά όπως οι μακρολίδες στα παιδιά, τα οποία αποτελούν την κύρια δεξαμενή ανθεκτικών πνευμονιοκόκκων. Αυτό υποστηρίζεται από μία πρόσφατη μελέτη από τη Νότια Αφρική, όπου παρατηρήθηκε αύξηση της αντοχής στις φθοριοκινολόνες σε στελέχη πνευμονιοκόκκου από παιδιά που έλαβαν θεραπεία με φθοριοκινολόνες για πολυανθεκτική (MDR) φυματίωση (Wolter και συν., 2009).

Συμπερασματικά, ο συστηματικός εμβολιασμός των παιδιών με το PCV7 στη χώρα μας είχε σημαντική επίδραση στην επιδημιολογία της πνευμονιοκοκκικής νόσου, όπως και σε πολλές άλλες χώρες. Στην παρούσα μελέτη μετά την εφαρμογή του PCV7 παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στην επίπτωση των διεισδυτικών και μη διεισδυτικών πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων, μείωση σε μεγάλο βαθμό των οροτύπων του εμβολίου και επικράτηση άλλων οροτύπων εκτός PCV7 (π.χ. 3, 7F και 19A). Η εισαγωγή του PCV10 με ευρύτερο φάσμα οροτύπων και κυρίως του PCV13 που συμπεριελάμβανε τους παραπάνω οροτύπους, είχε ουσιαστικό αντίκτυπο στην περαιτέρω μείωση της επίπτωσης της νόσου στα παιδιά, στην περιοχή της Αττικής, αλλά και σαν παράπλευρο αποτέλεσμα την ανάδυση άλλων παθογόνων οροτύπων εκτός PCVs.

Το πρόσθετο πλεονέκτημα των PCVs που σημειώθηκε σε μερικές Ευρωπαϊκές και άλλες χώρες, που αφορά στη μείωση της συχνότητας της μικροβιακής αντοχής, δεν παρατηρήθηκε στη μελέτη μας. Πιθανόν, η εμβολιαστική κάλυψη με PCV13, των παιδιών στη χώρα μας, να υπολείπεται ώστε να μην έχουν ακόμη μειωθεί σημαντικά οι ορότυποι 19A και 19F που συσχετίζονται με πολυαντοχή. Τέλος, μετά την ήδη διαπιστωθείσα ανάδυση νέων παθογόνων οροτύπων που δεν περιλαμβάνονται στα διαθέσιμα συζευγμένα εμβόλια, αναμένεται ότι ο πνευμονιόκοκκος θα συνεχίσει να αποτελεί κύριο αίτιο νοσηρότητας και θνητότητας τόσο σε παιδιά όσο και σε ενήλικες, γεγονός που επιβάλει τη συνεχή επιτήρηση της πνευμονιοκοκκικής νόσου, την ανάγκη παρασκευής PCVs με περισσότερους οροτύπους και την ανάπτυξη εμβολίων νέας τεχνολογίας (πρωτεϊνικών ή με ανασυνδυασμό DNA).

5. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή. Ο πνευμονιόκοκκος εξακολουθεί να αποτελεί σημαντικό παθογόνο για τον άνθρωπο προκαλώντας σοβαρές λοιμώξεις και υψηλή θνητότητα. Ο μεγάλος αριθμός των οροτύπων, η ανάδυση νέων οροτύπων μετά την εφαρμογή των συζευγμένων εμβολίων (PCVs) και η ανάπτυξη αντοχής στα αντιβιοτικά καθιστούν την συνεχή επιτήρηση της νόσου αναγκαία. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να εξετασθεί η εξέλιξη της πνευμονιοκοκικκής νόσου στα παιδιά, όσον αφορά στην επιδημιολογία, στις διακυμάνσεις των υπεύθυνων οροτύπων, πριν από και μετά την εφαρμογή των PCVs και την εξέλιξη της αντοχής στα αντιβιοτικά.

Υλικό και μέθοδοι. Η μελέτη διεξήχθη στο Νοσοκομείο Παίδων «Η Αγία Σοφία» κατά τη χρονική περίοδο 1986-2015 και συμπεριελήφθησαν παιδιά ενός μηνός μέχρι 14 ετών με πνευμονιοκοκκική λοίμωξη. Δημογραφικά και κλινικά δεδομένα συλλέχθηκαν από τους ιατρικούς φακέλους των ασθενών. Όλα τα στελέχη του πνευμονιοκόκκου που απομονώνονταν από στείρα περιοχή και από το μέσο ους συλλέγονταν από το τμήμα λοιμώξεων και φυλάσσονταν στους -80°C. Για την ταυτοποίηση των στελεχών χρησιμοποιήθηκαν οι κλασικές μικροβιολογικές τεχνικές και η ανίχνευση του γονιδίου *lytA* με PCR για τα ανθεκτικά στην οπτοχίνη στελέχη. Ο καθορισμός των οροτύπων έγινε με τις μεθόδους Latex και την εξοίδηση του ελύτρου χρησιμοποιώντας ειδικούς αντιορούς από το Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark.

Η ευαισθησία στα αντιβιοτικά ελέγχθηκε με τη μέθοδο των δίσκων (Kirby-Bauer) και με προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας με Etest. Τα ανθεκτικά στην πενικιλλίνη και στις μακρολίδες στελέχη εξετάσθηκαν για την παρουσία γονιδίων αντοχής με PCR χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές. Στελέχη του οροτύπου 19A χαρακτηρίσθηκαν περαιτέρω με πολυτοπικό προσδιορισμό αλληλούχισης (multilocus sequencing typing, MLST). Η ετήσια επίπτωση των διεισδυτικών πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων εκφράστηκε σε νέες περιπτώσεις/1000 εισαγωγές. Για τις κατηγορικές μεταβλητές χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία χ^2 και για τις συνεχείς μεταβλητές το *student t-test* ή το *Mann-Whitney U*. Η μεταβολή της επίπτωσης των διεισδυτικών πνευμονιοκοκικκών λοιμώξεων και οι μεταβολές στη συχνότητα των οροτύπων, πριν από και μετά την εφαρμογή των PCVs, εξετάσθηκαν με ανάλυση χρονολογικών σειρών (interrupted time series analysis, ITSA).

Αποτελέσματα. Συνολικά, 1875 παιδιά συμπεριελήφθησαν στη μελέτη, 1034 αγόρια και 841 κορίτσια με μέση ηλικία 33,92 μήνες, τα 953 είχαν διεισδυτική πνευμονιοκοκικκή νόσο (ΔΠΝ) και τα 922 οξεία μέση ωτίτιδα. Το 70,5% των λοιμώξεων παρατηρήθηκαν την περίοδο Οκτωβρίου-Μαρτίου και το 29,5% την περίοδο Απριλίου-Σεπτεμβρίου. Η ετήσια επίπτωση των διεισδυτικών λοιμώξεων ελαττώθηκε μετά την εφαρμογή των PCVs από 12,3/1000 εισαγωγές το 2005 σε 0,4/1000 εισαγωγές το 2015 (p < 0,001). Το 77,3% των λοιμώξεων προκλήθηκε από 12 οροτύπους: 19F, 14, 19A, 6B, 3, 7F, 23F, 6A, 1, 18C και 11A. Μετά την εφαρμογή του PCV7 διαπιστώθηκε σημαντική ελάττωση στη συχνότητα των οροτύπων του εν λόγω εμβολίου τόσο τις ΔΠΝ όσο και στις ωτίτιδες. Στις ΔΠΝ από 68,4% στην περίοδο 2001-2005 σε 31,4% και 7,6% στις περιόδους 2006-2010 και 2011-2015 αντίστοιχα. Η εφαρμογή του PCV13 το 2010 ανέστρεψε την ανοδική πορεία των οροτύπων 7F και 19A και ελάττωσε τη συχνότητα του οροτύπου 6A. Σημειωτέον μετά την εφαρμογή του PCV13 παρατηρήθηκε αύξηση οροτύπων που δεν περιλαμβάνονται στα συζευγμένα εμβόλια όπως οι: 11A, 23B, 10A, 15A, 15C, 23A, 15B, 24F, 35F, 22F και 6C.

Το 69% των στελεχών ήταν ευαίσθητα στην πενικιλλίνη, το 20% είχε ενδιάμεση ευαισθησία και το 11% είχε υψηλού επιπέδου αντοχή (MIC ≥ 2 μg/mL). Μετά το 1995 η αντοχή στην πενικιλλίνη, ερυθρομυκίνη, κλινδαμυκίνη, κοτριμοξαζόλη και τετρακυκλίνη αυξήθηκε προοδευτικά κατά τη διάρκεια της μελέτης και τα στελέχη με αντοχή σε ≥3 ομάδες αντιβιοτικών αυξήθηκαν από 0 % το 1986 σε 23.3% τη χρονική περίοδο 2011-2015, ενώ η αντοχή στη χλωραμφενικόλη ελαττώθηκε κατά 2,5 φορές και δεν σημειώθηκε αντοχή στην βανκομυκίνη, ριφαμπικίνη, μοξιφλοξασίνη και λινεζολίδη.

Σε όλα τα μη ευαίσθητα στην πενικιλλίνη στελέχη ανιχνεύθηκαν τροποποιημένα *pbps* γονίδια, τα πλέον συχνά ήταν: το *pbp2x* και οι συνδυασμοί, *pbp2x+pbp1a, pbp2b+ pbp2x+pbp1a.* Στα ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη στελέχη ανιχνεύθηκαν τα κάτωθι γονίδια κατά σειρά συχνότητας: *mef*(E) (41,6%), *erm*(B) (29,6%), ο συνδυασμός *mef*(E) + *erm*(B) (17%) και *mef*(A) (11,8%). Σημειωτέον ότι το 93,6% των στελεχών που περιείχαν το γονίδιο *mef(*A) ανήκαν στον ορότυπο 14 και οι πλέον συχνοί ορότυποι στα πολυανθεκτικά στελέχη ήταν οι 19A και 19F. Τα 27 από τα 31 εξετασθέντα στελέχη του οροτύπου 19A ανήκαν σε 4 κλωνικά συμπλέγματα CC172, CC199, CC320 και CC276. Το στελέχη των συμπλεγμάτων CC172 και CC199 ήταν παρόντα καθ όλη τη διάρκεια της μελέτης, ενώ τα στελέχη των CC320 και CC276 εμφανίστηκαν μετά το 2009.

Συμπεράσματα. Τα ανωτέρω δεδομένα αποτυπώνουν την επιδημιολογία των πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων στα παιδιά, κατά τη χρονική περίοδο 1986-2015 στην περιοχή της Αττικής. Επιπλέον παρέχονται πληροφορίες για τα φαινοτυπικά και γενετικά χαρακτηριστικά των παθογόνων στελεχών. Μετά την εφαρμογή των PCVs παρατηρήθηκε σημαντική ελάττωση στην επίπτωση των πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων, μείωση του επιπολασμού των οροτύπων που περιλαμβάνονται στα PCVs και ανάδυση νέων παθογόνων οροτύπων, τόσο στις ΔΠΝ όσο και στις ωτίτιδες. Τα ανθεκτικά στην πενικιλλίνη στελέχη και τα στελέχη με αντοχή σε ≥ 3 ομάδες αντιβιοτικών αυξήθηκαν προοδευτικά μετά το 1995 και οι πλέον συχνοί ορότυποι στα πολυανθεκτικά στελέχη ήταν οι 19A και 19F. Τα ευρήματα αυτά δίνουν σημαντικές πληροφορίες για τη χάραξη στρατηγικής στην αντιμετώπιση και πρόληψη των πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων.

6. SUMMARY

Introduction. Streptococcus pneumoniae remains a major cause of morbidity and mortality worldwide. It continues to cause invasive and non-invasive diseases in children such as bacteremia, meningitis, pneumonia, acute otitis media, mastoiditis and sinusitis. The large number of existing serotypes, the switch to non-vaccine serotypes after the implementation of conjugate vaccines (PCVs) and the development of resistance to antibiotics make the constant surveillance of pneumococcal disease necessary. The purpose of this study was to examine the evolution of pneumococcal disease in children in our region, in terms of epidemiology, the fluctuations of responsible serotypes before and after implementation of PCVs and the development of antibiotic resistance.

Material and methods. The study was conducted in Aghia Sophia Children's Hospital, Athens, Greece, during the period 1986-2015 and included children one month to 14 years old with pneumococcal infection. Demographics and clinical data were collected from patients' medical records. All *S. pneumoniae* isolates derived from normally sterile sites and middle ear cultures of children hospitalized or visiting the emergency room of Aghia Sophia Children's Hospital were prospectively collected and stored at −80°C at infectious disease research laboratory. The isolates were limited to one per patient. Identification of *S. pneumoniae* was confirmed by conventional microbiologic techniques including optochin sensitivity and bile solubility testing. Isolates exhibiting resistance to optochin underwent further testing with polymerase chain reaction (PCR) for the *lytA* gene. Serogrouping of isolates was performed with Pneumotest kit- latex agglutination test and serotyping by the quellung reaction using type-specific antisera from Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark.

The susceptibility to antibiotics was determined by the disc diffusion method (Kirby-Bauer) and by Etest. Non-susceptible isolates to penicillin and macrolide were examined for the presence of resistant genes by PCR using specific primers. Serotype 19A isolates were further characterized by multilocus sequencing typing (MLST). The data were processed and analyzed using the SPSS statistics software. The annual incidence of invasive pneumococcal infections was expressed in new cases/1000 hospital admissions. The x^2 test was used for categorical variables and the Student *t* test (for normally distributed variables) or the Mann-Whitney *U* test (for non-normally distributed variables) for continuous variables. The changes in the incidence of invasive pneumococcal disease (IPD) and in the frequency of

serotypes before and after the use of PCVs, were examined by interrupted time series analysis (ITSA).

Results. Overall, 1875 children were included in the study, 1034 boys and 841 girls with mean age of 33.92 months, 953 had IPD and 922 acute otitis media. 70.5% of the infections were observed in the period October to March and 29.5% in the period April to September. After implementation of PCVs, the annual incidence of invasive infections decreased from 12.3/1000 hospital admissions in 2005 to 0.4/1000 hospital admissions in 2015 ($p < 0,001$). 77.3% of all infections were caused by 12 serotypes: 19F, 14, 19A, 6B, 3, 7F, 23F, 6A, 1, 18C and 11A. After the introduction of PCV7, a significant decrease in the frequency of vaccine serotypes was observed in both IPD and in middle ear infections; in IPD the vaccine serotypes declined from 68.4% in 2001-2005 to 31.4 and 7.6% in the periods 2006-2010 and 2011-2015 respectively. The implementation of PCV13 in 2010 was associated with reversal of the upward trend of serotypes 7F and 19A, decrease in the frequency of serotype 6A and increase in the non-PCV13 serotypes such as 11A, 23B, 10A, 15A, 15C, 23A, 15B, 24F, 35F, 22F και 6C.

Sixty nine percent of isolates were susceptible to penicillin, 20% had intermediate susceptibility and 11% were resistant (MIC ≥ 2 μg/mL). After 1995, resistance to penicillin, erythromycin, clindamycin, cotrimoxazole and tetracycline progressively increased while resistance to chloramphenicol was reduced by 2.5 times. Isolates with resistance to ≥ 3 groups of antibiotics increased from 0% in 1986 to 23.3% between 2011 and 2015. All isolates were susceptible to vancomycin, rifampin, moxifloxacin and linezolid. Modified *pbps* genes were detected in all isolates non-susceptible to penicillin and the most frequent were: the *pbp2x* and the combinations, *pbp2x* + *pbp1a and pbp2b* + *pbp2x* + *pbp1a.* In erythromycin resistant isolates the following genes were detected in order of frequency: *mef*(E) (41,6%), *erm*(B) (29.6%), the combination *mef*(E) + *erm*(B) (17%), *mef*(A) (11.8%). Notably, 93.6% of the isolates containing the *mef*(A) gene belonged to serotype 14 and the most frequent serotypes in multidrug-resistant strains were the 19A and 19F. Twenty seven of the 31 isolates of serotype 19A belonged to four clonal complexes; CC172, CC199, CC320 and CC276. The clonal complexes CC172 and CC199 were present throughout the study period, while the clonal complexes CC320 and CC276 appeared after 2009.

Conclusions. The data presented herein provide information on the epidemiology of pneumococcal infections in children between 1986 and 2015 in Attica region as well as on

the phenotypic and genetic characteristics of *S. pneumoniae* isolates. After introduction of PCVs the incidence of pneumococcal infections was reduced and the prevalence of PCV serotypes declined while the non-PCV serotypes increased. The penicillin resistant strains as well as the isolates resistant to ≥ 3 groups of antibiotics increased gradually after 1995. The most frequent serotypes in multidrug-resistant strains were the 19A and 19F. These findings have implications on developing strategies for the treatment and prevention of pneumococcal infections.

III. ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ACIP	Advisory Committee on Immunization Practices	Συμβουλευτική Επιτροπή για την Ανοσοποίηση
CAT	Chloramphenicol acetyltransferase	Ακετυλοτρανσφεράση της χλωραμφενικόλης
CC	Clonal complex	Προσδιορισμός κλώνου
CDC	Centers for Disease Control and Prevention	Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων ΗΠΑ
CLI	Clindamycin	Κλινδαμυκίνη
CI	Confidence Interval	Διάστημα Εμπιστοσύνης
CHL	Chloramphenicol	Χλωραμφενικόλη
CTX	Cefotaxime	Κεφοταξίμη
CRM_{197}	Cross-Reactive Materials (non-toxic mutant of diphtheria toxin)	Μη τοξική μεταλλαγμένη τοξίνη της διφθερίτιδας
CRP	C-Reactive Protein	C-αντιδρώσα πρωτεΐνη
ΔΠΝ		Διεισδυτική Πνευμονιοκοκκική Νόσος
DHFR	Dihydrofolate reductase	Διυδροφολική αναγωγάση
DHPS	Dihydropteroate synthase	Διυδροπτερική συνθετάση
DNA	Deoxyribonucleic acid	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
DT	Diphtheria Toxoid	Τοξοειδές διφθερίτιδας
ENY		Εγκεφαλονωτιαίο υγρό
ERY	Erythromycin	Ερυθρομυκίνη
FDA	Food and Drug Administration	Οργανισμός τροφίμων και φαρμάκων
Hib	*Haemophilus influenzae type b*	Αιμόφιλος ινφλουέντζας τύπου b
HIV	Human Immunodeficiency Virus	Ιός ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας
ΗΠΑ		Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής
IPD	Invasive Pneumococcal Disease	Διεισδυτική πνευμονιοκοκκική νόσος
ITSA	Interrupted Iime Series Analysis	Ανάλυση χρονολογικών σειρών
LZD	Linezolid	Λινεζολίδη
MDR	Multidrug resistance	Αντοχή σε ≥ 3 αντιβιοτικά
MEE	Multilocus Enzyme Electrophoresis	Ηλεκτροφόρηση πολλών θέσεων ένζυμου
MIC	Minimal Inhibitory Concentration	Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση
MLST	Multilocus Sequence Typing	Πολυτοπικός προσδιορισμός αλληλουχίας
MXF	Moxifloxacin	Μοχιφλοξασίνη
ΜΠΩ		Μέση πυώδης ωτίτιδα
NTHi	Non typable *Haemophilus influenzae*	Μη τροποποιήσιμος Αιμόφιλος ινφλουέντζας
PBPs	Penicillin-binding proteins	Πενικιλλινο-δεσμευτικές πρωτεΐνες
PCR	Polymerase Chain Reaction	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
PCV	Pneumococcal Conjugate Vaccine	Συζευγμένο πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο
PCV7	7-valent pneumococcal conjugate vaccine (Prevenar7)	7-δύναμο συζευγμένο πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο

PCV10	10-valent pneumococcal conjugate vaccine (Synflorix)	10-δύναμο συζευγμένο πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο
PCV13	13-valent pneumococcal conjugate vaccine (Prevenar13)	13-δύναμο συζευγμένο πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο
PCT	Procalcitonin	Προκαλσιτονίνη
PEN	Penicillin G	Πενικιλλίνη G
PFGE	Pulsed-field gel electrophoresis	Ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο πεδίο
PPSV	Pneumococcal polysaccharide vaccine	Πολυσακχαριδικό πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο
PPSV23	23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine	23-δύναμο πολυσακχαριδικό πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο
PsaA	Pneumococcal surface antigen A	Πνευμονιοκοκκικό επιφανειακό αντιγόνο A
PspA	Pneumococcal surface protein A	Πνευμονιοκοκκική επιφανειακή πρωτεΐνη A
PspC	Pneumococcal surface protein C	Πνευμονιοκοκκική επιφανειακή πρωτεΐνη C
QRDRs	Quinolone resistance-determining regions	Καθοριστικές για αντοχή στις κινολόνες περιοχές
RIF	Rifampicin	Ριφαμπικίνη
RFLP	Restriction fragment length polymorphism	Πολυμορφισμός μήκους περιοριστικών κλασμάτων
ST	Sequence Typing	Προσδιορισμό της αλληλουχίας
TET	Tetracycline	Τετρακυκλίνη
TKE		Ταχύτητα καθίζησης ερυθρών αιμοσφαιρίων
TLR2	Toll-like receptor 2	Υποδοχέας Toll-like 2
TLR4	Toll-like receptor 4	Υποδοχέας Toll-like 4
TT	Tetanus Toxoid	Τοξοειδές τετάνου
SXT	Trimethoprim-sulfamethoxazole	Τριμεθοπρίμη-σουλφομεθοξαζόλη
VAN	Vancomycin	Βανκομυκίνη
WHO	World Health Organization	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ)

IV. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

A

Adam HJ, Hoban DJ, Gin AS, Zhanel GG. Association between fluoroquinolone usage and a dramatic rise in ciprofloxacin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Canada, 1997-2006. *Int J Antimicrob Agents* 2009;34:82-5.

Adrian PV, Klugman KP. Mutations in the dihydrofolate reductase gene of trimethoprim-resistant isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41:2406-13.

Alderson MR. Status of research and development of pediatric vaccines for *Streptococcus pneumoniae*. *Vaccine* 2016;34:2959-61.

Alpern ER, Alessandrini EA, Bell LM, Shaw KN, McGowan KL. Occult bacteremia from a pediatric emergency department: current prevalence, time to detection, and outcome. *Pediatrics* 2000;106:505-11.

Andreola B, Bressan S, Callegaro S, Liverani A, Plebani M, Da Dalt L. Procalcitonin and C-reactive protein as diagnostic markers of severe bacterial infections in febrile infants and children in the emergency department. *Pediatr Infect Dis J.* 2007;26:672-7.

Andrews NJ, Waight PA, George RC, Slack MP, Miller E. Impact and effectiveness of 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine against invasive pneumococcal disease in the elderly in England and Wales. *Vaccine* 2012;30:6802-8.

Andrews NJ, Waight PA, Burbidge P, Pearce E, Roalfe L, Zancolli M,Slack M, Ladhani SN, Miller E, Goldblatt D. Serotype-specific effectiveness and correlates of protection for the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine: a post licensure indirect cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2014;14:839-46.

Antachopoulos C, Tsolia MN, Tzanakaki G, Xirogianni A, Dedousi O, Markou G, Zografou SM, Eliades A, Kirvassilis F, Kesanopoulos K, Roilides E. Parapneumonic pleural effusions caused by *Streptococcus pneumoniae* serotype 3 in children immunized with 13-valent conjugated pneumococcal vaccine. *Pediatr Infect Dis J.* 2014;33:81-3.

Arditi M, Mason EO Jr, Bradley JS, Tan TQ, Barson WJ, Schutze GE, Wald ER, Givner LB, Kim KS, Yogev R, Kaplan SL. Three-year multicenter surveillance of pneumococcal meningitis in children: clinical characteristics, and outcome related to penicillin susceptibility and dexamethasone use. *Pediatrics* 1998;102:1087-97.

Austrian R. Pneumococcal infection and pneumococcal vaccine. *N Engl J Med.* 1977a; 297:938-9.

Austrian R. Session II. Immunity to encapsulated bacteria prevention of pneumococcal infection by immunization with capsular polysaccharides of *streptococcus pneumoniae*: current status of polyvalent vaccines. *J Infect Dis.* 1977b;36:S38 -S42.

Austrian R. Pneumococcus: the first one hundred years. *Rev Infect Dis.*1981;3:183-9.

Austrian R, Gold J. Pneumococcal bacteremia with especial reference to bacteremic pneumococcal pneumonia. *Ann Intern Med.* 1964;60:759-76.

Austrian R, Douglas RM, Schiffman G, Coetzee AM, Koornhof HJ, Hayden-Smith S, Reid RD. Prevention of pneumococcal pneumonia by vaccination. *Trans Assoc Am Physicians* 1976;89:184-94.

B

Bachur R, Harper MB. Reevaluation of outpatients with *Streptococcus pneumoniae* bacteremia. *Pediatrics* 2000;105:502-9.

Balsalobre L, Ferrandiz MJ, Linares J, Tubau F, de la Campa AG. Viridans group streptococci are donors in horizontal transfer of topoisomerase IV genes to *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:2072-81.

Barricarte A, Castilla J, Gil-Setas A, Torroba L, Navarro-Alonso JA, Irisarri F, Arriazu M. Effectiveness of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine: a population based case-control study. *Clin Infect Dis.* 2007;44:1436-41.

Beall BW, Gertz RE, Hulkower RL, Whitney CG, Moore MR, Brueggemann AB. Shifting genetic structure of invasive serotype 19A pneumococci in the United States. *J Infect Dis*. 2011;203:1360-8.

Beckler E, Macleod P. The Neufeld method of pneumococcus type determination as carried out in a public health laboratory: a study of 760 typings. *J Clin Invest*. 1934;13:901-7.

Ben-Shimol S, Givon-Lavi N, Leibovitz E, Raiz S, Greenberg D, Dagan R. The impact of the widespread introduction of pneumococcal conjugate vaccines on pneumococcal and non-pneumococcal otitis media. *Clin Infect Dis.* 2016 May 25. pii: ciw347.

Biglan A, Ary D, Wagenaar AC.The value of interrupted yime-Series experiments for community intervention research. *Prev Sci.* 2000 ;1:31-49

Bingen EH, Denamur E, Elion J. Use of ribotyping in epidemiological surveillance of nosocomial outbreaks. *Clin Microbiol Rev.* 1994;7:311-27.

Black S, Eskola J, Whitney C, Shinefield H. Pneumococcal conjugate vaccine and pneumococcal common protein vaccines, p 531-568. In Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA (ed), Vaccines, 5th ed. 2008, WB Saunders Company, Philadelphia, PA.

Black S, France EK, Isaacman D, Bracken L, Lewis E, Hansen J, Fireman B, Austrian R, Graepel J, Gray S, Klein NP. Surveillance for invasive pneumococcal disease during 2000-2005 in a population of children who received 7-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J*. 2007;26:771-7.

Black S, Shinefield H. Safety and efficacy of the seven valent pneumococcal conjugate vaccine: evidence from Northern California. *Eur J Pediatr.* 2002a;161:S127-31.

Black S, Shinefield H, Fireman B. Efficacy, safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. Northern California Kaiser Permanente Vaccine Study Center Group. *Pediatr Infect Dis J.* 2000;19:187-95.

Black SB, Shinefield HR, Ling S, Hansen J, Fireman B, Spring D, Noyes J, Lewis E, Ray P, Lee J, Hackell J. Effectiveness of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children younger than five years of age for prevention of pneumonia. *Pediatr Infect Dis J.* 2002b;21:810-15.

Bley C, van der Linden M, Reinert RR. *mef*(A) is the predominant macrolide resistance determinant in *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* in Germany. *Int J Antimicrob Agents* 2011;37:425-31.

Bocchini JA Jr, Bradley JS, Brady MT, Bernstein HH, Byington CL, Fisher MC, Glode MP, Jackson MA, Keyserling HL, Kimberlin DW, Orenstein WA, Schutze GE, Willoughby RE Jr. Recommendations for the prevention of *Streptococcus pneumoniae* infections in infants and children: use of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13) and pneumococcal polysaccharide vaccine (PPSV23). *Pediatrics* 2010;126:186-90.

Bogaert D, De Groot R, Hermans PW. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis*. 2004;4:144-54.

Bogaert D, Syrogiannopoulos GA, Grivea IN, de Groot R, Beratis NG, Hermans PW. Molecular epidemiology of penicillin-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* among children in Greece. *J Clin Microbiol.* 2000;38:4361-6.

Bonten MJ, Huijts SM, Bolkenbaas M, Webber C, Patterson S, Gault S, van Werkhoven CH, van Deursen AM, Sanders EA, Verheij TJ, Patton M, McDonough A, Moradoghli-Haftvani A, Smith H, Mellelieu T, Pride MW, Crowther G, Schmoele-Thoma B, Scott DA, Jansen KU, Lobatto R, Oosterman B, Visser N, Caspers E, Smorenburg A, Emini EA, Gruber WC, Grobbee DE. Polysaccharide conjugate vaccine against pneumococcal pneumonia in adults. *N Engl J Med.* 2015;372:1114-25.

Breiman RF, Butler JC, Tenover FC, Elliott JA, Facklam RR. Emergence of drug-resistant pneumococcal infections in the United States. *JAMA* 1994; 271:1831-5.

Bronzwaer SL, Cars O, Buchholz U, Mölstad S, Goettsch W, Veldhuijzen IK, Kool JL, Sprenger MJ, Degener JE; European Antimicrobial Resistance Surveillance System. A European study on the relationship between antimicrobial use and antimicrobial resistance. *Emerg Infect Dis.* 2002;8:278-82.

Bui NK, Eberhardt A, Vollmer D, Kern T, Bougault C, Tomasz A, Simorre JP, Vollmer W. Isolation and analysis of cell wall components from *Streptococcus pneumoniae*. *Anal Biochem.* 2012;421:657-66.

Buie KA, Klugman KP, von Gottberg A, Perovic O, Karstaedt A, Crewe-Brown HH, Madhi SA, Feldman C.Gender as a risk factor for both antibiotic resistance and infection with pediatric serogroups in HIV-infected and -uninfected adults with pneumococcal bacteremia. *J Infect Dis.* 2004;189:1996-2000.

Burman LA, Norrby R, Trollfors B. Invasive pneumococcal infections: incidence, predisposing factors, and prognosis. *Rev Infect Dis.* 1985;7:133-42.

Butler JC, Shapiro ED, Carlone GM. Pneumococcal vaccines: history, current status, and future directions. *Am J Med.* 1999;107:69S-76S.

Byington CL, Spencer LY, Johnson TA, Pavia AT, Allen D, Mason EO, Kaplan S, Carroll KC, Daly JA, Christenson JC, Samore MH.An epidemiological investigation of a sustained high rate of pediatric parapneumonic empyema: risk factors and microbiological associations. *Clin Infect Dis.* 2002;34:434-40.

Byington CL, Korgenski K, Daly J, Ampofo K, Pavia A, Mason EO. Impact of the pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal parapneumonic empyema. *Pediatr Infect Dis.* 2006;25:250-4.

C

Calix JJ, Nahm MH. A new pneumococcal serotype, 11E, has a variably inactivated wcjE Gene. *J Infect Dis.* 2010;202:29-38.

Canton R, Morosini M, Enright MC, Morrissey I. Worldwide incidence, molecular epidemiology and mutations implicated in fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae*: data from the global PROTEKT surveillance programme. *J Antimicrob Chemother.* 2003;52:944-52.

Carvalho MG, Steigerwalt AG, Thompson T, Jackson D, Facklam RR. Confirmation of nontypeable *Streptococcus pneumoniae*-like organisms isolated from outbreaks of epidemic conjunctivitis as *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol.* 2003;41:4415-7.

Casado Flores J, Nieto Moro M, Berrón S, Jiménez R, Casal J. Usefulness of pneumococcal antigen detection in pleural effusion for the rapid diagnosis of infection by *Streptococcus pneumoniae*. *Eur J Pediatr.* 2010;169:581-4.

Casey JR, Adlowitz DG, Pichichero ME. New patterns in the otopathogens causing acute otitis media six to eight years after introduction of pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J.* 2010;29:304-9.

Center KJ. Prevenar vaccination: review of the global data, 2006. *Vaccine* 2007;25:3085-9.

Centers for Disease Control (CDC). Update: pneumococcal polysaccharide vaccine usage-United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.*1984;33(20):273-6, 281.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Direct and indirect effects of routine vaccination of children with 7-valent pneumococcal conjugate vaccine on incidence of invasive pneumococcal disease-United States, 1998-2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2005;54:893-7.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Invasive pneumococcal disease in children 5 years after conjugate vaccine introduction-eight states, 1998-2005. *Morb Mortal Wkly Rep.* 2008;57:144-8.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Invasive pneumococcal disease in young children before licensure of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine - United States, 2007. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2010a;59:253-7.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Licensure of a 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13) and recommendations for use among children. Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2010b;59:258-61.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Use of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine and 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine for adults with immunocompromising conditions: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2012; 61**:**816-9.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Use of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine and 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine among children aged 6-18 years with immunocompromising conditions: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2013;62:521-4.

Cha R, Rybak MJ. Linezolid and vancomycin, alone and in combination with rifampin, compared with moxifloxacin against a multidrug-resistant and a vancomycin-tolerant *Streptococcus pneumoniae* strain in an in vitro pharmacodynamics model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:1984-7.

Chen DK, McGeer A, de Azavedo JC, Low DE. Decreased susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* to fluoroquinolones in Canada. *N Engl J Med.* 1999;341:233-9.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 18th informational supplement, CLSI Document M100-S18, 2008. Wayne, PA.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. In: 24th Informational Supplement, CLSI document M100-S24, 2014 Wayne, PA.

Clutterbuck EA, Lazarus R, Yu LM, Bowman J, Bateman EA, Diggle L, Angus B, Peto TE, Beverley PC, Mant D, Pollard AJ. Pneumococcal conjugate and plain polysaccharide vaccines have divergent effects on antigen-specific B cells. *J Infect Dis.* 2012; 205:1408-16.

Cochetti I, Vecchi M, Mingoia M, Tili E, Catania MR, Manzin A, Varaldo PE, Montanari MP.Molecular characterization of pneumococci with efflux-mediated erythromycin resistance and identification of a novel *mef* gene subclass, *mef*(I). *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:4999-5006.

Cochetti I, Tili E, Vecchi M, Manzin A, Mingoia M, Varaldo PE, Montanari MP. New *Tn*916-related elements causing *erm*(B)-mediated erythromycin resistance in tetracycline-susceptible pneumococci. *J Antimicrob Chemother.* 2007;60:127-31.

Cochetti I, Tili E, Mingoia M, Varaldo PE, Montanari MP. *erm*(B)-carrying elements in tetracycline-resistant pneumococci and correspondence between *Tn*1545 and *Tn*6003. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:1285-90.

Coffey TJ, Daniels M, McDougal LK, Dowson CG, Tenover FC, Spratt BG. Genetic analysis of clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* with high-level resistance to expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39:1306-13.

Coffey, T.J., Dowson, C.G., Daniels, M. and Spratt, B.G. Horizontal spread of an altered penicillin-binding protein 2B gene between *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus oralis*. *FEMS Microbiology Letters* 1993;110, 335-9.

Cohen R, Varon E, Doit C, Schlemmer C, Romain O, Thollot F, Béchet S, Bonacorsi S, Levy C. A 13-year survey of pneumococcal nasopharyngeal carriage in children with acute otitis media following PCV7 and PCV13 implementation. *Vaccine* 2015;33:5118-26.

Connell, S.R., Tracz, D.M., Nierhaus, K.H. and Taylor, D.E. Ribosomal Protection Proteins and their mechanism of tetracycline resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47, 3675-81.

Cooper G, Rosenstein C, Walter A, Peizer L. The further separation of types among the pneumococci hitherto included in group IV and the development of therapeutic antisera for these types. *J Exp Med.* 1932; 55:531-54

Couloigner V, Levy C, François M, Bidet P, Hausdorff WP, Pascal T, Boucherat M, Bingen E, Mariani P, Pierrot S, Bille E, Carbonnelle E, Varon E, Cohen R. Pathogens implicated in acute otitis media failures after 7-valent pneumococcal conjugate vaccine implementation in France: distribution, serotypes, and resistance levels. *Pediatr Infect Dis J.* 2012;31:154-8.

Crowther-Gibson P, Cohen C, Klugman KP, de Gouveia L, von Gottberg A, Group for Enteric, Respiratory, and Meningeal disease Surveillance in South Africa (GERMS-SA). Risk factors for multidrugresistant invasive pneumococcal disease in South Africa, a setting with high HIV prevalence, in the prevaccine era from 2003 to 2008. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56:5088-95

Cutts FT, Zaman SM, Enwere G, Jaffar S, Levine OS, Okoko JB, Oluwalana C, Vaughan A, Obaro SK, Leach A, McAdam KP, Biney E, Saaka M, Onwuchekwa U, Yallop F, Pierce NF, Greenwood BM, Adegbola RA; Gambian Pneumococcal Vaccine Trial Group. Efficacy of nine valent pneumococcal conjugate vaccine against pneumonia and invasive pneumococcal disease in The Gambia: randomised, double-blind, placebo controlled trial. *Lancet* 2005;365:1139-46.

D

Dagan R, Engelhard D, Piccard E. Epidemiology of invasive childhood pneumococcal infections in Israel. The Israeli Pediatric Bacteremia and Meningitis Group. *JAMA* 1992;268:3328-32.

Dagan R, Givon-Lavi N, Greenberg D, Fritzell B, Siegrist CA. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* shortly before vaccination with a pneumococcal conjugate vaccine causes serotype-specific hyporesponsiveness in early infancy. *J Infect Dis.* 2010; 201:1570-79.

Dagan R, Juergens C, Trammel J, Patterson S, Greenberg D, Givon-Lavi N, Porat N, Gurtman A, Gruber WC, Scott DA. Efficacy of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13) versus that of 7-valent PCV (PCV7) against nasopharyngeal colonization of antibiotic-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae. J Infect Dis.* 2015;211:1144-53.

Dagan R, Klugman KP. Impact of conjugate pneumococcal vaccine on antibiotic resistance. *Lancet Infect. Dis.* 2008;8:785-95.

Dagan R, Melamed R, Muallem M, Piglansky L, Yagupsky P. Nasopharyngeal colonization in southern Israel with antibiotic-resistant pneumococci during the first 2 years of life: relation to serotypes likely to be included in pneumococcal conjugate vaccines. *J Infect Dis.* 1996; 174:1352-55.

Daikos GL, Koutsolioutsou A, Tsiodras S, Theodoridou M, Koutouzis EI, Charissiadou A, Pangalis A, Michos AG, Chaidopoulou F, Braoudaki M, Syriopoulou VP. Evolution of macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates in the prevaccine era. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008;60:393-8.

Davies TA, Bush K, Sahm D, Evangelista A. Predominance of 23S rRNA mutants among non-erm, non-mef macrolide-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* collected in the United States in 1999-2000. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:3031-33.

Davies TA, Flamm RK, Lynch AS. Activity of ceftobiprole against *Streptococcus pneumoniae* isolates exhibiting high-level resistance to ceftriaxone. *Int J Antimicrob Agents* 2012;39:534-8.

Deceuninck G, De Wals P, Boulianne N, De Serres G.Effectiveness of pneumococcal conjugate vaccine using a 2+1 infant schedule in Quebec, Canada. *Pediatr Infect Dis J.* 2010;29:546-9.

de Roux A, Schmöle-Thoma B, Siber GR, Hackell JG, Kuhnke A, Ahlers N, Baker SA, Razmpour A, Emini EA, Fernsten PD, Gruber WC, Lockhart S, Burkhardt O, Welte T, Lode HM. Comparison of pneumococcal conjugate polysaccharide and free polysaccharide vaccines in elderly adults: conjugate vaccine elicits improved antibacterial immune responses and immunological memory. *Clin Infect Dis.* 2008;46:1015-23

Del Grosso M, Iannelli F, Messina C, Santagati M, Petrosillo N, Stefani S, Pozzi G, Pantosti A. Macrolide efflux genes *mef*(A) and *mef*(E) are carried by different genetic elements in *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 774-8.

Doit C, Loukil C, Geslin P, Bingen E. Phenotypic and genetic diversity of invasive pneumococcal isolates recovered from French children. *J Clin Microbiol.* 2002;40:2994-8.

Dominguez A, Ciruela P, Garcia-Garcia JJ, Moraga F, de Sevilla MF, Selva L, Coll F, Muñoz-Almagro C, Planes AM, Codina G, Jordan I, Esteva C, Hernandez S, Soldevila N, Cardenosa N, Batalla J, Salleras L. Effectiveness of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine in the prevention of invasive pneumococcal disease in children aged 7-59 months.A matched case-control study. *Vaccine* 2011;29:9020-25.

Dong W, Chochua S, McGee L, Jackson D, Klugman KP, Vidal JE. Mutations within the rplD gene of linezolid nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* strains isolated in the USA. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58:2459-62.

Donkor ES, Badoe EV. Insights into Pneumococcal Pathogenesis and Antibiotic Resistance *Advances in Microbiology* 2014; 4: 627-43.

Douglas RM, Paton JC, Duncan SJ, Hansman DJ. Antibody response to pneumococcal vaccination in children younger than five years of age. *J Infect Dis.* 1983;148:131-7.

Douglas RM, Hansman D, Miles HB, Paton JC. Pneumococcal carriage and type-specific antibody. Failure of a 14-valent vaccine to reduce carriage in healthy children. *Am J Dis Child.* 1986;140:1183-85.

Dowell SF, Butler JC, Giebink GS, Jacobs MR, Jernigan D, Musher DM, Rakowsky A, Schwartz B. Acute otitis media: management and surveillance in an era of pneumococcal resistance-a report from the Drug-Resistant *Streptococcus pneumoniae* Therapeutic Working Group. *Pediatr Infect Dis J*. 1999;18:1-9.

Dowell SF, Whitney CG, Wright C, Rose CE Jr, Schuchat A. Seasonal patterns of invasive pneumococcal disease. *Emerg Infect Dis*. 2003; 9:573-9.

Dzierzanowska-Fangrat K, Semczuk K, Górska P, Giedrys-Kalemba S, Kochman M, Samet A, Tyski S, Dzierzanowska D, Trzciński K. Evidence for tetracycline resistance determinant tet (M) allele replacement in a *Streptococcus pneumoniae* population of limited geographical origin. *Int J Antimicrob Agents* 2006;27:159-64.

E

Edson DC, Glick T, Massey LD. Susceptibility testing practices for *Streptococcus pneumoniae*: results of a proficiency testing survey of clinical laboratories. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2006;55:225-30.

Enright MC,Spratt BG. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology* 1998;144:3049-60.

Enright MC, Spratt BG. Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol.* 1999;7:482-7.

Eskola J, Kilpi T, Palmu A, Jokinen J, Haapakoski J, Herva E, Takala A, Käyhty H, Karma P, Kohberger R, Siber G, Mäkelä PH; Finnish Otitis Media Study Group. Efficacy of a pneumococcal conjugate vaccine against acute otitis media. *N Engl J Med.* 2001;344:403-9.

F

Farnham AC, Zimmerman CM, Papadouka V, Konty KJ, Zucker JR, Nattanmai GV, Jose S, Rosen JB. Invasive pneumococcal disease following the introduction of 13-valent conjugate vaccine in children in New York city from 2007 to 2012. *JAMA Pediatr.* 2015;169:646-52.

Farrell DJ, Couturier C, Hryniewicz W. Distribution and antibacterial susceptibility of macrolide resistance genotypes in *Streptococcus pneumoniae*: PROTEKT Year 5 (2003-2004). *Int J Antimicrob Agents* 2008;31:245-9.

Farrell DJ, Jenkins SG, Brown SD, Patel M, Lavin BS, Klugman KP. Emergence and spread of *Streptococcus pneumoniae* with *erm*(B) and *mef*(A) resistance. *Emerg Infect Dis.* 2005; 11:851-8.

Farrell DJ, Morrissey I, Bakker S, Felmingham D. Molecular characterization of macrolide resistance mechanisms among *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* isolated from the PROTEKT 1999-2000 study. *J Antimicrob Chemother.* 2002;50 (Suppl. S1):39-47.

Farrell DJ, Morrissey I, Bakker S, Buckridge S, Felmingham D. In vitro activities of telithromycin, linezolid, and quinupristin-dalfopristin against *Streptococcus pneumoniae* with macrolide resistance due to ribosomal mutations. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:3169-71.

Feikin DR, Klugman KP. Historical changes in pneumococcal serogroup distribution: implications for the era of pneumococcal conjugate vaccines. *Clin Infect Dis.* 2002;35:547-55.

Feikin DR, Kagucia EW, Loo JD, Link-Gelles R, Puhan MA, Cherian T, Levine OS, Whitney CG, O'Brien KL, Moore MR; Serotype Replacement Study Group. Serotype-specific changes in invasive pneumococcal disease after pneumococcal conjugate vaccine introduction: a pooled analysis of multiple surveillance sites. *PLoS Med.* 2013;10:e1001517.

Felmingham D, Canton R, Jenkins SG. Regional trends in beta-lactam, macrolide, fluoroquinolone and telithromycin resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolates 2001-2004. *J Infect.* 2007;55:111-118.

Felton LD. Studies on immunizing substances in pneumococci. VII. Response in human beings to antigenic pneumococcus polysaccharides, type I and II. *Public Health Rep.* 1938;53:2855-77.

Feng J, Lupien A, Gingras H, Wasserscheid J, Dewar K, Légaré D, Ouellette M. Genome sequencing of linezolid resistant *Streptococcus pneumoniae* mutants reveals novel mechanisms of resistance. *Genome Res.* 2009;19:1214-23.

Fenoll A, Aguilar L, Vicioso MD, Gimenez MJ, Robledo O, Granizo JJ. Increase in serotype 19A prevalence and amoxicillin non-susceptibility among paediatric *Streptococcus pneumoniae* isolates from middle ear fluid in a passive laboratory-based surveillance in Spain, 1997-2009. *BMC Infect Dis.* 2011;11:239.

Ferrandiz MJ, Ardanuy C, Linares J, Garcia-Arenzana JM, Cercenado E, Fleites A, de la Campa AG. New mutations and horizontal transfer of rpoB among rifampin-resistant *Streptococcus pneumoniae* from four Spanish hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:2237-45.

Flamm RK, Sader HS, Farrell DJ, Jones RN. Antimicrobial activity of ceftaroline tested against drug-resistant subsets of *Streptococcus pneumoniae* from U.S. medical centers. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58:2468-71.

Fletcher MA, Fritzell B Brief review of the clinical effectiveness of PREVENAR® against otitis media. *Vaccine* 2007;25:2507-12.

Frenck R Jr, Thompson A, Yeh SH, London A, Sidhu MS, Patterson S, Gruber WC, Emini EA, Scott DA, Gurtman A; 3011 Study Group.mmunogenicity and safety of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in children previously immunized with 7-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J.* 2011;30:1086-91.

Friedland IR, Klugman KP. Antibiotic-resistant pneumococcal disease in South African children. *Am J Dis Child.* 1992a;146:920-23.

Friedland IR, Klugman KP. Failure of chloramphenicol in penicillin-resistant pneumococcal meningitis. *Lancet* 1992b;339:405-8.

G

Garcia-Bustos JF, Chait BT, Tomasz A. Structure of the peptide network of pneumococcal peptidoglycan. *J Biol Chem.* 1987;262:15400-5.

Geno KA, Gilbert GL, Song JY, Skovsted IC, Klugman KP, Jones C, Konradsen HB, Nahm MH. Pneumococcal Capsules and Their Types: Past, Present, and Future. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28:871-99.

Giannakopoulos P, Chrysovergis A, Xirogianni A, Nikolopoulos TP, Radiotis A, Lebessi E, Tsakanikos M, Tzanakaki G, Tsolia MN. Microbiology of acute mastoiditis and complicated or refractory acute otitis media among hospitalized children in the postvaccination era. *Pediatr Infect Dis J.* 2014;33:111-3.

Gillis LM, White HD, Whitehurst A, Sullivan DC. Vancomycin-tolerance among clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Mississippi during 1999-2001. *Am J Med Sci.* 2005;330:65-68.

Godot C, Levy C, Varon E, Picard C, Madhi F, Cohen R. Pneumococcal meningitis vaccine breakthroughs and failures after routine 7-Valent and 13-Valent pneumococcal conjugate vaccination in children in France. *Pediatr Infect Dis J.* 2015;34:e260-3.

Goldblatt D, O'Brien KL. Pneumococcal Infections 171;946-954. Kasper DL, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J editors. 19th ed. Harrison's principles of internal medicine. New York: Copyright © 2015 by McGraw-Hill Education

Grabenstein JD, Musey LK.. Differences in serious clinical outcomes of infection caused by specific pneumococcal serotypes among adults. *Vaccine* 2014;32:2399-2405.

Granizo JJ, Aguilar L, Casal J, Garcia-Rey C, Dal-Re R, Baquero F. *Streptococcus pneumoniae* resistance to erythromycin and penicillin in relation to macrolide and beta-lactam consumption in Spain (1979–1997). *J. Antimicrob. Chemother.* 2000;46, 767-73.

Gray B. *Streptococcus pneumoniae* infections In: Stevens DL KE, editor. Streptococcal Infections: Clinical Aspects, Microbiology, and Molecular Pathogenesis *New York: Oxford University Press* 2000;302-332.

Gray BM, Converse GM 3rd, Dillon HC Jr. Epidemiologic studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: acquisition, carriage, and infection during the first 24 months of life. *J Infect Dis.* 1980;142:923-33.

Gray BM, Turner ME, Dillon Jr HC. Epidemiologic studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: the effects of season and age on pneumococcal acquisition and carriage in the first 24 months of life. *Am J Epidemiol.* 1982;116:692-703.

Grebe T, Hakenbeck R. Penicillin-binding proteins 2b and 2x of *Streptococcus pneumoniae* are primary resistance determinants for different classes of β-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40:829-34.

Greenwood B. The epidemiology of pneumococcal infection in children in the developing world. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1999;354:777-85.

Grivea IN, Tsantouli AG, Michoula AN, Syrogiannopoulos GA. Dynamics of Streptococcus pneumoniae nasopharyngeal carriage with high heptavalent pneumococcal conjugate vaccine coverage in Central Greece. *Vaccine* 2011;29:8882-7.

H

Haber M, Barskey A, Baughman W, Barker L, Whitney CG, Shaw KM, Orenstein W, Stephens DS. Herd immunity and pneumococcal conjugate vaccine: a quantitative model. *Vaccine* 2007;25:5390-8.

Hakenbeck R, Balmelle N, Weber B, Garde`s C, Keck W, de Saizieu A. Mosaic genes and mosaic chromosomes: intra- and interspecies genomic variation of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 2001;69:2477-86.

Hakenbeck R, Bruckner R, Denapaite D, Maurer P. Molecular mechanisms of beta-lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Future Microbiol.* 2012;7:395-410.

Hall LM. Application of molecular typing to the epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Pathol.* 1998;51:270-4.

Hanquet G, Lernout T, Vergison A, Verhaegen J, Kissling E, Tuerlinckx D, Malfroot A, Swennen B, Sabbe M; Belgian IPD Scientific CommitteeImpact of conjugate 7-valent vaccination in Belgium: addressing methodological challenges. *Vaccine* 2011;29:2856-64.

Hansman D, Bullen MM: A resistant pneumococcus (letter to the editor). *Lancet* 1967; 2:264-5.

Hansman D, Glasgow H, Sturt J, Devitt L, Douglas R. Increased resistance to penicillin of pneumococci isolated from man. *N Engl J Med.* 1971; 284:175-7.

Harboe ZB, Valentiner-Branth P, Ingels H, Rasmussen JN, Andersen PH, Bjerre CC, Goldblatt D, Ashton L, Haston M, Konradsen HB, Lambertsen L; Danish Pneumococcal Surveillance Collaborating Group.Pediatric invasive pneumococcal disease caused by vaccine serotypes following the introduction of conjugate vaccination in Denmark. *PLoS One*. 2013;8:e51460.

Harboe ZB, Dalby T, Weinberger DM, Benfield T, Molbak K, SlotvedHC, Suppli CH, Konradsen HB, Valentiner-Branth P. Impact of 13-valent pneumococcal conjugate vaccination in invasive pneumococcal disease incidence and mortality. *Clin Infect Dis.* 2014; 59:1066-73.

Hausdorff WP. Invasive pneumococcal disease in children: geographic and temporal variations in incidence and serotype distribution. *Eur J Pediatr.* 2002a;161 Suppl 2:S135-9.

Hausdorff WP, Bryant J, Paradiso PR, Siber GR. Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. *Clin Infect Dis.* 2000a;30:100-21.

Hausdorff WP, Bryant J, Kloek C, Paradiso PR, Siber GR. The contribution of specific pneumococcal serogroups to different disease manifestations: implications for conjugate vaccine formulation and use, part II. *Clin Infect Dis.* 2000b;30:122

Hausdorff WP, Feikin DR, Klugman KP. Epidemiological differences among pneumococcal serotypes. *Lancet Infect Dis.* 2005;5:83-93.

Hausdorff WP, Siber G, Paradiso PR. Geographical differences in invasive pneumococcal disease rates and serotype frequency in young children. *Lancet* 2001;357:950-2.

Hausdorff WP, Van Dyke MK, Van Effelterre T.Serotype replacement after pneumococcal vaccination. *Lancet* 2012;379:1387-8.

Hausdorff WP, Yothers G, Dagan R, Kilpi T, Pelton SI, Cohen R, Jacobs MR, Kaplan SL, Levy C, Lopez EL, Mason EO Jr, Syriopoulou V, Wynne B, Bryant J. Multinational study of pneumococcal serotypes causing acute otitis media in children. *Pediatr Infect Dis J.* 2002b;21:1008-16.

Henrichsen J. Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol.* 1995;33:2759-62.

Henrichsen J. Typing of *Streptococcus pneumoniae*: Past, Present, and Future. *Am J Med.* 1999;107:50S-54S.

Henriques-Normark B, Tuomanen EI. The pneumococcus: epidemiology, microbiology, and pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3:1-16.

Herva E, Luotonen J, Timonen M, Sibakov M, Karma P, Makela PH. The effect of polyvalent pneumococcal polysaccharide vaccine on nasopharyngeal and nasal carriage of *Streptococcus pneumoniae*. *Scand J Infect Dis.* 1980;12:97-100.

Hicks LA, Chien YW, Taylor Jr TH, Haber M, Klugman KP, Active Bacterial Core Surveillance (ABCs) Team. Outpatient antibiotic prescribing and nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* in the United States, 1996-2003. *Clin Infect Dis.* 2011;53:631-9.

Hicks LA, Harrison LH, Flannery B, Hadler JL, Schaffner W, Craig AS, Jackson D, Thomas A, Beall B, Lynfield R, Reingold A, Farley MM, Whitney CG; Active Bacterial Core Surveillance ProGram of the Emerging Infections ProGram Network. Incidence of Pneumococcal Disease Due to Non-Pneumococcal Conjugate Vaccine (PCV7) Serotypes in the United States during the Era of Widespread PCV7 Vaccination, 1998-2004. *J Infect Dis.* 2007;196:1346-54.

Ho PL, Yam WC, Cheung TK, Ng WW, Que TL, Tsang DN, Ng TK, Seto WH. Fluoroquinolone resistance among *Streptococcus pneumoniae* in Hong Kong linked to the Spanish 23F clone. *Emerg Infect Dis.* 2001;7:906-8.

Hoffken G, Lorenz J, Kern W, Welte T, Bauer T, Dalhoff K, Dietrich E, Ewig S, Gastmeier P, Grabein B, Halle E, Kolditz M, Marre R, Sitter H. S3-guideline on ambulant acquired pneumonia and deep airway infections. *Pneumologie* 2005;59:612-64.

Hoppe JE, Köster S, Bootz F, Niethammer D. Acute mastoiditis-relevant once again. *Infection* 1994;22:178-82.

Hsu KK, Shea KM, Stevenson AE, Pelton SI. Massachusetts Department of Public Health. Changing serotype causing childhood invasive pneumococcal disease: Massachusetts, 2001-2007. *Pediatr Infect Dis J.* 2010;29:289-93.

Hyams C, Camberlein E, Cohen JM, Bax K, Brown JS. The *Streptococcus pneumoniae* capsule inhibits complement activity and neutrophil phagocytosis by multiple mechanisms. *Infect Immun*. 2010;78:704-15.

Isaacman DJ, McIntosh ED, Reinert RR. Burden of invasive pneumococcal disease and serotype distribution among *Streptococcus pneumoniae* isolates in young children in Europe: impact of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine and considerations for future conjugate vaccines. *Int J Infect Dis.* 2010;14(3):e197-209.

J

Jacobs MR, Bajaksouzian S, Appelbaum PC, Bolmström A. Evaluation of the Etest for susceptibility testing of pneumococci. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1992;15:473-8.

Jacobs MR, Koornhof HJ, Robins-Browne RM, Stevenson CM, Vermaak ZA, Freiman I, Miller GB, Witcomb MA, Isaäcson M, Ward JI, Austrian R. Emergence of multiply resistant pneumococci. *N Engl J Med.* 1978; 299:735-40.

Janoff EN, Musher DM. *Streptococcus pneumoniae*. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases / edited by John E. Bennett, Raphael Dolin, Martin J. Blaser. - Eighth edition. Copyright © 2015 by Saunders, an imprint of Elsevier Inc. Philadelphia.

Jenkins SG, Farrell DJ. Increase in pneumococcus macrolide resistance, United States. *Emerg Infect Dis.* 2009;15:1260-64.

Jokinen J, Palmu AA, Kilpi T. Acute otitis media replacement and recurrence in the Finnish otitis media vaccine trial. *Clin Infect Dis.* 2012;55:1673-76.

Jones RN, Jacobs MR, Sader HS. Evolving trends in *Streptococcus pneumoniae* resistance: implications for therapy of community-acquired bacterial pneumonia. *Int J Antimicrob Agents* 2010;36:197-204.

Jumbe NL, Louie A, Miller MH, Liu W, Deziel MR, Tam VH, Bachhawat R, Drusano GL.Quinolone efflux pumps play a central role in emergence of fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:310-7.

K

Kaltoft MS, Zeuthen N, Konradsen HB. Epidemiology of invasive pneumococcal infections in children aged 0–6 years in Denmark: a 19-year nationwide surveillance study. *Acta Paediatr*. Suppl 2000;89:3-10.

Kaplan SL, Barson WJ, Lin PL, et al. Early trends for invasive pneumococcal infections in children after the introduction of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J*. 2013;32:203-7.

Kaplan SL, Mason EO Jr, Wald E, Tan TQ, Schutze GE, Bradley JS, Givner LB, Kim KS, Yogev R, Barson WJ. Six year multicenter surveillance of invasive pneumococcal infections in children. *Pediatr Infect Dis J.* 2002;21:141-7.

Kaplan SL, Mason EO Jr, Wald ER, Schutze GE, Bradley JS, Tan TQ, Hoffman JA, Givner LB, Yogev R, Barson WJ. Decrease of invasive pneumococcal infections in children among 8 children's hospitals in the United States after the introduction of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatrics* 2004;113:443-9.

Kellner JD, Vanderkooi OG, MacDonald J, Church DL, Tyrrell GJ, Scheifele DW. Changing epidemiology of invasive pneumococcal disease in Canada, 1998-2007: update from the Calgary-area research (CASPER) study. *Clin Infect Dis.* 2009;49:205-12.

Kelly T, Dillard JP, Yother J. Effect of Genetic Switching of Capsular Type on Virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 1994; 62, 1813-19.

Kennedy WA, Chang SJ, Purdy K, LE T, Kilgore PE, Kim JS, Anh DD, Huong PL, Dong BQ, Tan DM, Clemens JD, Ward JI. Incidence of bacterial meningitis in Asia using enhanced CSF testing: polymerase chain reaction, latex agglutination and culture. *Epidemiol Infect.* 2007;135:1217-26.

Kisgen JJ, Mansour H, Unger NR, Childs LM. Tedizolid: a new oxazolidinone antimicrobial. *Am J Health Syst Pharm.* 2014;71:621-33.

Klein JO. The epidemiology of pneumococcal disease in infants and children. *Rev Infect Dis.* 1981;3:246-53.

Klein JO. Otitis media. *Clin Infect Dis.* 1994;19:823-33.

Klugman KP, Cutts F, Adegbola RA, et al. Meta-analysis of the efficacy of conjugate vaccines against invasive pneumococcal disease. In: Siber GR, Klugman KP, Ma¨kela¨ PH, editors. Pneumococcal vaccines: the impact of conjugate vaccine. *ASM Press*, Washington DC, USA, 2008.

Klugman KP, Friedland IR, Bradley JS. Bactericidal activity against cephalosporin-resistant *S. pneumoniae* in CSF of children with acute bacterial meningitis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39:1988-92.

Klugman KP, Madhi SA, Huebner RE, Kohberger R, Mbelle N, Pierce N; Vaccine Trialists Group. A trial of a 9-valent pneumococcal conjugate vaccine in children with and those without HIV infection. *N Engl J Med.* 2003;349:1341-8.

Konradsen HB, Kaltoft MS. Invasive pneumococcal infections in Denmark from 1995 to 1999: epidemiology, serotypes, and resistance. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002;9:358-65.

Kosowska K, Jacobs MR, Bajaksouzian S, Koeth L, Appelbaum PC. Alterations of penicillin-binding proteins 1A, 2X and 2B in *Streptococcus pneumoniae* isolates with amoxicillin MICs are higher than penicillin MICs. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:4020-2.

Koutouzis EI. Daikos GL, Roma E, Charissiadou A , Pangalis A, Liakopoulou T , Theodoridou M, Michos A , Syriopoulou VP. *Streptococcus pneumoniae* serotypes before and after introduction of pneumococcal conjugate vaccine in Greece. 6th International Symposium on Pneumococci & Pneumococcal Diseases, (ISPPD), Reykjavik, Iceland, 8-12 June 2008.

Koutouzis EI, Michos A, Koutouzi FI, Chatzichristou P, Parpounas K, Georgaki A, Theodoridou M, Tsakris A, Syriopoulou VP. Pneumococcal mastoiditis in children before and after the introduction of conjugate pneumococcal vaccines. *Pediatr Infect Dis J.* 2016;35:292-6.

Kuch A, Sadowy E, Skoczyńska A, Hryniewicz W. First report of *Streptococcus pneumoniae* serotype 6D isolates from invasive infections. *Vaccine* 2010; 28: 6406-7.

Kyaw MH, Lynfield R, Schaffner W, Craig AS, Hadler J, Reingold A, Thomas AR, Harrison LH, Bennett NM, Farley MM, Facklam RR, Jorgensen JH, Besser J, Zell ER, Schuchat A, Whitney CG. Effect of introduction of the pneumococcal conjugate vaccine on drug-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *N Engl J Med.* 2006;354:1455-63.

Kyaw MH, Rose CE Jr, Fry AM, Singleton JA, Moore Z, Zell ER, Whitney CG. The influence of chronic illnesses on the incidence of invasive pneumococcal disease in adults. *J Infect Dis*. 2005;192:377-86.

L

Ladhani SN, Slack MP, Andrews NJ, et al. Invasive pneumococcal disease after routine pneumococcal conjugate vaccination in children, England and Wales. *Emerg Infect Dis*. 2013;19:61-68.

Laible G, Spratt BG, Hakenbeck R. Interspecies recombinational events during the evolution of altered PBP 2x genes in penicillin resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* 1991;5:1993-2002.

Lau WC, Murray M, El-Turki A, Saxena S, Ladhani S, Long P, Sharland M, , Hsia Y. Impact of pneumococcal conjugate vaccines on childhood otitis media in the United Kingdom. *Vaccine* 2015;33:5072-9.

Leal J, Vanderkooi OG, Church DL, Macdonald J, Tyrrell GJ, Kellner JD Eradication of invasive pneumococcal disease due to the seven-valent pneumococcal conjugate vaccine serotypes in Calgary, Alberta. *Pediatr Infect Dis J.* 2012;31:e169-75.

Leclercq R, Courvalin P. Resistance to macrolides and related antibiotics in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:2727-34.

Lefevre JC, Faucon G, Sicard AM, Gasc AM. DNA fingerprinting of *Streptococcus pneumoniae* strains by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol.*1993;3:2724-8.

Lehmann D, Willis J, Moore HC, Giele C, Murphy D, Keil AD, Harrison C, Bayley K, Watson M, Richmond P. The changing epidemiology of invasive pneumococcal disease in aboriginal and non-aboriginal western Australians from 1997 through 2007 and emergence of nonvaccine serotypes. *Clin Infect Dis.* 2010;50:1477-86.

Leinonen M, Säkkinen A, Kalliokoski R, Luotonen J, Timonen M, Mäkelä PH. Antibody response to 14-valent pneumococcal capsular polysaccharide vaccine in pre-school age children. *Pediatr Infect Dis.* 1986;5:39-44.

Levy C, Varon E, Bingen E, Lécuyer A, Boucherat M, Cohen R; Bacterial Meningitis Study Group. Pneumococcal meningitis in french children before and after the introduction of pneumococcal conjugate vaccine.*Pediatr Infect Dis J.*2011;30:168-70.

Levy C, Varon E, Picard C, Béchet S, Martinot A, Bonacorsi S, Cohen R. Trends of pneumococcal meningitis in children after introduction of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in France. *Pediatr Infect Dis J.* 2014;33:1216-21.

Li X, Zhao X, Drlica K. Selection of *Streptococcus pneumoniae* mutants having reduced susceptibility to moxifloxacin and levofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:522-4.

Light RW, Girard WM, Jenkinson SG, George RB. Parapneumonic effusions. *Am J Med.* 1980;69:507-12.

Lindberg B, Lindqvist B, Lonngren J, Powell DA. Structural studies of the capsular polysaccharide from *Streptococcus pneumoniae* type1. *Carbohydr Res.*1980;78:111-117.

Link-Gelles R, Thomas A, Lynfield R, Petit S, Schaffner W, Harrison L, Farley MM, Aragon D, Nicols M, Kirley PD, Zansky S, Jorgensen J, Juni BA, Jackson D, Moore MR, Lipsitch M. Geographic and temporal trends in antimicrobial nonsusceptibility in *Streptococcus pneumoniae* in the post-vaccine era in the United States. *J Infect Dis.* 2013;208:1266-73.

Lucero MG, Dulalia VE, Nillos LT, Williams G, Parreno RA, Nohynek H, Riley ID, Makela H. Pneumococcal conjugate vaccines for preventing vaccine-type invasive pneumococcal disease and X-ray defined pneumonia in children less than two years of age. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009 CD004977.

Lynch JP 3rd, Zhanel GG. *Streptococcus pneumoniae*: does antimicrobial resistance matter? *Semin Respir Crit Care Med.* 2009;30:210-38.

Lund E. Laboratory diagnosis of pneumococcus infections. *Bull World Health Organ.* 1960;23:5-13.

M

Macleod CM, Hodges RG, Heidelberger M, Bernhard WG. Prevention of pneumococcal pneumonia by immunization with specific capsular polysaccharides. *J Exp Med.* 1945;82:445-65.

Madhi S, Pelton S. Epidemiology, diagnosis, and treatment of serious pneumococcal infections in children. In: Siber G, Klugman KP, Makela P, eds. Pneumococcal Vaccines: The Impact of Conjugate Vaccine. Washington, DC: *ASM Press* 2008:95-166

Magee AD, Yother J. Requirement for Capsule in Colonization by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 2001;69:3755-61.

Makela PH, Butler JC. History of pneumococcal immunization. In: Siber GR, Klugman KP, Makela PH, editors. Pneumococcal vaccines: the impact of conjugate vaccines. Washington, DC: *ASM Press* 2008;19-29.

Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, Bartlett JG, Campbell GD, Dean NC, Dowell SF, File TM Jr, Musher DM, Niederman MS, Torres A, Whitney CG; Infectious Diseases Society of America; American Thoracic Society. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of communityacquired pneumonia in adults. *Clin Infect Dis.* 2007;44 (Suppl. 2):S27-72.

Maraki S, Samonis G, Galanakis E. Serotypes and susceptibilities of paediatric clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Crete, Greece, before and after the heptavalent pneumococcal conjugate vaccine. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2010;29:1449-51.

Marchant A, Goldman M. T cell-mediated immune responses in human newborns: ready to learn? *Clin Exp Immunol.* 2005;141:10-18.

Marsh R, Smith-Vaughan H, Hare KM, Binks M, Kong F, Warning J,Gilbert GL, Morris P, Leach AJ. The nonserotypeable pneumococcus:phenotypic dynamics in the era of anticapsular vaccines. *J ClinMicrobiol.* 2010;48:831-5.

Martin C, Sibold C, Hakenbeck R. Relatedness of penicillin-binding protein 1a genes from different clones of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolated in South Africa and Spain. *EMBO J.* 1992;11:3831-36.

Maskell JP, Sefton AM, Hall LM. Multiple mutations modulate the function of dihydrofolate reductase in trimethoprim-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:1104-8.

Massidda O, Novakova L, Vollmer W. From models to pathogens: how much have we learned about *Streptococcus pneumoniae* cell division? *Environ Microbiol.* 2013;15:3133-57.

McCarthy PL, Grundy GW, Spiesel SZ, Dolan TF Jr. Bacteremia in children: an outpatient clinical review. *Pediatrics* 1976;57:861-8.

McCarthy PL, Jekel JF, Stashwick CA, Spiesel SZ, Dolan TF, Sharpe MR, Forsyth BW, Baron MA, Fink HD, Rosenbloom ML, Etkin T, Zelson JH. Further definition of history and observation variables in assessing febrile children. *Pediatrics* 1981;67:687-93.

McDougal LK, Rasheed JK, Biddle JW, Tenover FC. Identification of multiple clones of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995;39:2282-88.

McEllistrem MC, Adams JM, Patel K, Mendelsohn AB, Kaplan SL, Bradley JS, Schutze GE, Kim KS, Mason EO, Wald ER. Acute otitis media due to penicillin-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* before and after the introduction of the pneumococcal conjugate vaccine. *Clin Infect Dis.* 2005;40:1738-4

McGee L, McDougal L, Zhou J, Spratt BG, Tenover FC, George R, Hakenbeck R, Hryniewicz W, Lefévre JC, Tomasz A, Klugman KP. Nomenclature of major antibiotic resistant clones of *Streptococcus pneumoniae* defined by the Pneumococcal Molecular Epidemiology Network. *J Clin Microbiol.* 2011;39:2565-71.

Meka VG, Gold HS. Antimicrobial resistance to linezolid. *Clin Infect Dis.* 2004;39:1010-15.

Miller E, Andrews NJ, Waight PA, Slack MP, George RC. Herd immunity and serotype replacement 4 years after seven-valent pneumococcal conjugate vaccination in England and Wales: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2011a;11:760-8.

Miller E, Andrews NJ, Waight PA, Slack MP, George RC. Effectiveness of the new serotypes in the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Vaccine* 2011b;29:9127-31.

Mingoia M, Vecchi M, Cochetti I, Tili E, Vitali LA, Manzin A, Varaldo PE, Montanari MP. Composite structure of *Streptococcus pneumoniae* containing the erythromycin efflux resistance gene *mef*(I) and the chloramphenicol resistance gene catQ. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:3983-7.

Moore CE, Paul J, Foster D, Mahar SA, Griffiths D, Knox K, Peto TE, Walker AS, Crook DW; Oxford Invasive Pneumococcal Surveillance Group. Reduction of invasive pneumococcal disease 3 years after the introduction of the 13-valent conjugate vaccine in the Oxfordshire region of England. *J Infect Dis.* 2014;210:1001-11.

Moscoso M, Domenech M, García E.Vancomycin tolerance in clinical and laboratory *Streptococcus pneumoniae* isolates depends on reduced enzyme activity of the major LytA autolysin or cooperation between CiaH histidine kinase and capsular polysaccharide. *Mol Microbiol.* 2010;77:1052-64.

Mthwalo M, Wasas A, Huebner R, Koornhof HJ, Klugman KP. Antimicrobial resistance of nasopharyngeal isolates of *Streptococcus pneumoniae* from children in Lesotho. *Bull World Health Organ.* 1998;76:641-50.

Muñoz-Almagro C, Esteva C, de Sevilla MF, Selva L, Gene A, Pallares R. Emergence of invasive pneumococcal disease caused by multidrug-resistant serotype 19A among children in Barcelona. *J Infect.* 2009;59:75-82.

Murray J, Agócs M, Serhan F, Singh S, Deloria-Knoll M, O'Brien K, Mwenda JM, Mihigo R, Oliveira L, Teleb N, Ahmed H, Wasley A, Videbaek D, Wijesinghe P, Thapa AB, Fox K, Paladin FJ, Hajjeh R, Schwartz S, Van Beneden C, Hyde T, Broome C, Cherian T; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Global invasive bacterial vaccine-preventable diseases surveillance--2008-2014. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2014;63:1159-62.

Musher D, Dagan R. Is the pneumococcus the one and only in acute otitis media? *Pediatr Infect Dis J.* 2000;19:399-400.

N

Nagai K1, Shibasaki Y, Hasegawa K, Davies TA, Jacobs MR, Ubukata K, Appelbaum PC. Evaluation of PCR primers to screen for *Streptococcus pneumoniae* isolates and beta-lactam resistance, and to detect common macrolide resistance determinants. *J Antimicrob Chemother.* 2001;48:915-8.

Nielsen SV, Henrichsen J. Incidence of invasive pneumococcal disease and distribution of capsular types of pneumococci in Denmark, 1989-94. *Epidemiol Infect.* 1996;117:411-16.

Novak R, Henriques B, Charpentier E, Normark S, Tuomanen E. Emergence of vancomycin tolerance in *Streptococcus pneumoniae*. *Nature* 1999;399:590-3.

Nuorti JP, Whitney CG. Prevention of pneumococcal disease among infants and children, use of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine and 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine, recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep.* 2010;59**:**1-18.

O

Obaro SK, Adegbola RA, Banya WA, Greenwood BM. Carriage of pneumococci after pneumococcal vaccination. *Lancet* 1996;348:271-2.

O'Brien KL, Hochman M, Goldblatt D. Combined schedules o pneumococcal conjugate and polysaccharide vaccines: is hyporesponsiveness an issue? *Lancet Infect Dis.* 2007; 7:597-606.

O'Brien KL, Moulton LH, Reid R, Weatherholtz R, Oski J, Brown L, Kumar G, Parkinson A, Hu D, Hackell J, Chang I, Kohberger R, Siber G, Santosham M. Efficacy and safety of seven-valent conjugate pneumococcal vaccine in American Indian children: group randomized trial. *Lancet* 2003;362:355-61.

O'Brien KL, Santosham M. Potential impact of conjugate pneumococcal vaccines on pediatric pneumococcal diseases. *Am J Epidemiol.* 2004;159:634-44.

O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, Henkle E, Deloria-Knoll M, McCall N, Lee E, Mulholland K, Levine OS, Cherian T; Hib and Pneumococcal Global Burden of Disease Study Team. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet* 2009;374:893-902.

Oftadeh S, Satzke C, Gilbert GL. Identification of newly described *Streptococcus pneumoniae* serotype 6D by use of the Quellung reaction and PCR. *J Clin Microbiol.* 2010;48:3378-79.

Ogunniyi AD., Paton JC. Vaccine Potential of Pneumococcal Proteins 4:59-78 Brown J, Hammerschmidt S, Orihuela C, editors. *Streptococcus pneumoniae* Molecular Mechanisms of Host pathogen Interactions Copyright © 2015 Elsevier Inc.

Olson LC, Jackson MA. Only the pneumococcus.*Pediatr Infect Dis J.*1999;18:849-50.

Ongkasuwan J, Valdez TA, Hulten KG, Mason EO Jr, Kaplan SL. Pneumococcal mastoiditis in children and the emergence of multidrug-resistant serotype 19A isolates. *Pediatrics* 2008;122:34-9.

Ort S, Ryan JL, Barden G, D'Esopo N. Pneumococcal pneumonia in hospitalized patients: clinical and radiological presentations. *JAMA* 1983;249:214-18.

Ortega M, Marco F, Soriano A, Garcia E, Martinez JA, Mensa J. Lack of vancomycin tolerance in *Streptococcus pneumoniae* strains isolated in Barcelona, Spain, from 1999 to 2001. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:1976-78.

P

Padayachee T, Klugman KP. Novel expansions of the gene encoding dihydropteroate synthase in trimethoprim-sulfamethoxazole-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43:2225-30.

Pai R, Moore MR, Pilishvili T, Gertz RE, Whitney CG, Beall B; Active Bacterial Core Surveillance Team. Postvaccine genetic structure of *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A from children in the United States. *J Infect Dis.* 2005;192:1988-95.

Palmu AA, Jokinen J, Borys D, Nieminen H, Ruokokoski E, Siira L, Puumalainen T, Lommel P, Hezareh M, Moreira M, Schuerman L, Kilpi TM. Effectiveness of the ten-valent pneumococcal Haemophilus influenza protein D conjugate vaccine (PHiD-CV10) against invasive pneumococcal disease: a cluster randomized trial. *Lancet* 2013;381:214-22.

Paradiso PR. Pneumococcal conjugate vaccine for adults: a new paradigm. *Clin Infect Dis.* 2012;55:259-64.

Paraskakis, I., Kafetzis, D.A., Chrisakis, A., Papavasilliou, H., Kirikou, H., Pangalis, A., Tzouvelekis, L.S., Athanasiou, T. and Legakis, N.J. Serotypes and antimicrobial susceptibilities of 1033 pneumococci isolated from children in Greece during 2001-2004. *Clin Microbiol Infet.* 2006;12:490-3.

Park IH , Pritchard DG, Cartee R, Brandao A, Brandileone MC, Nahm MH. Discovery of a new capsular serotype (6C) within serogroup 6 of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* 2007;45:1225-33.

Park SY, Van Beneden CA, Pilishvili T, Martin M, Facklam RR, Whitney CG. Invasive pneumococcal infections among vaccinated children in the United States. *J Pediatr.* 2010;156:478-483.

Parra EL, Ramos V, Sanabria O, Moreno J. Serotype and genotype distribution among invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates in Colombia, 2005-2010. *PLoS One* 2014;9:e84993.

Patel SN, McGeer A, Melano R, Tyrrell GJ, Green K, Pillai DR. Susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* to fluoroquinolones in Canada. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55:3703-8.

Pedersen MK, Hoiby EA, Froholm LO, Hasseltvedt V, Lermark G, Caugant DA. Systemic pneumococcal disease in Norway 1995-2001: capsular serotypes and antimicrobial resistance. *Epidemiol Infect.* 2004;132:167-75.

Peltola H. Burden of meningitis and other severe bacterial infections of children in Africa: implications for prevention. *Clin Infect Dis.* 2001;32:64-75.

Pelton SI, Jacobs MR. Pneumococcal Infections 85;1198-1246. Cherry JD, Harrison GJ, Kaplan SL, Steinbach WJ, Hotez PJ. Editors. 7th ed. Feigin & Cherry's Textbook of Pediatric Infectious Diseases, Philadelphia, Copyright © 2014, by Saunders, an imprint of Elsevier Inc.

Picazo J, Ruiz-Contreras J, Casado-Flores J, Giangaspro E, García-de-Miguel MJ, Hernández-Sampelayo T, Otheo E, Méndez C; Heracles Study Group. Impact of introduction of conjugate vaccines in the vaccination schedule on the incidence of pediatric invasive pneumococcal disease requiring hospitalization in Madrid 2007 to 2011. *Pediatr Infect Dis J.* 2013;32:656-61.

Pilishvili T, Lexau C, Farley MM, Hadler J, Harrison LH, Bennett NM, Reingold A, Thomas A, Schaffner W, Craig AS, Smith PJ, Beall BW, Whitney CG, Moore MR. Sustained reductions in invasive pneumococcal disease in the era of conjugate vaccine. *J Infect Dis.* 2010;201:32-41.

Pletz MW, Fugit RV, McGee L, Glasheen JJ, Keller DL, Welte T, Klugman KP. Fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Emerg Infect Dis.* 2006;12:1462-63.

Pletz MW, McGee L, Beall B, Whitney CG, Klugman KP. Interspecies recombination in type II topoisomerase genes is not a major cause of fluoroquinolone resistance in invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:779-80.

Pletz MW, van der Linden M, von Baum H, Duesberg CB, Klugman KP, Welte T; CAPNETZ study group. Low prevalence of fluoroquinolone resistant strains and resistance precursor strains in *Streptococcus pneumoniae* from patients with community-acquired pneumonia despite high fluoroquinolone usage. *Int J Med Microbiol.* 2011;301:53-7.

Poolman J, Frasch C, Nurkka A, Kayhty H, Biemans R, Schuerman L. Impact of the conjugation method on the immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae* serotype 19F polysaccharide in conjugate vaccines. *Clin Vaccine Immunol.* 2011;18:327-36.

Poolman JT, Peeters CC, van den Dobbelsteen GP. The history of pneumococcal conjugate vaccine development:dose selection.*Expert Rev Vaccines* 2013;12:1379-94.

Pozzi G, Iannelli F, Oggioni MR, Santagati M, Stefani S. Genetic elements carrying macrolide efflux genes in streptococci.*Curr Drug Targets Infect Disord*.2004;4:203-6.

R

Reinert RR. The antimicrobial resistance profile of *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect.* 2009;15 Suppl 3:7-11.

Reinert RR, Wild A, Appelbaum P, Lutticken R, Cil MY, Al-Lahham A. Ribosomal mutations conferring resistance to macrolides in *Streptococcus pneumoniae* clinical strains isolated in Germany. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47:2319-22.

Reynolds PE. Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1989;8:943-50.

Richter SS, Heilmann KP, Dohrn CL, Riahi F, Beekmann SE, Doern GV. Changing Epidemiology of Antimicrobial-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States, 2004-2005. *Clin Infect Dis.* 2009; 48:e23-33.

Robbins JB, Austrian R, Lee CJ, Rastogi SC, Schiffman G, Henrichsen J, Makela PH, Broome CV, Facklam RR, Tiesjema RH, Parke JC, Jr. Considerations for formulating the second-generation pneumococcal capsular polysaccharide vaccine with emphasis on the crossreactive types within groups. *J Infect Dis.* 1983;148:1136-59.

Rodgers GL, Arguedas A, Cohen R, Dagan R. Global serotype distribution among *Streptococcus pneumoniae* isolates causing otitis media in children: potential implications for pneumococcal conjugate vaccines. *Vaccine* 2009;27:3802-10.

Rodriguez-Cerrato V, McCoig CC, Saavedra J, Barton T, Michelow IC, Hardy RD, Bowlware K, Iglehart J, Katz K, McCracken GH Jr. Garenoxacin (BMS-284756) and moxifloxacin in experimental meningitis caused by vancomycin-tolerant pneumococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:211-15.

Rosen C, Christensen P, Hovelius B, Prellner K. A longitudinal study of the nasopharyngeal carriage of pneumococci as related to pneumococcal vaccination in children attending day-care centres. *Acta Otolaryngol.* 1984;98:524-32.

Ruckinger S, van der Linden M, Reinert RR, von Kries R. Efficacy of 7-valent pneumococcal conjugate vaccination in Germany: an analysis using the indirect cohort method. *Vaccine* 2010;28:5012-16.

S

Santagati M, Iannelli F, Oggioni MR, Stefani S, Pozzi G. Characterization of a genetic element carrying the macrolide efflux gene *mef*(A) in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44: 2585-87.

Schrag SJ, McGee L, Whitney CG, Beall B, Craig AS, Choate ME, Jorgensen JH, Facklam RR, Klugman KP. Emergence of Streptococcus pneumonia with very -high-level resistance to penicillin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:3016-23.

Schrag SJ, Peña C, Fernández J, Sánchez J, Gómez V, Pérez E, Feris JM, Besser RE. Effect of short-course, high-dose amoxicillin therapy on resistant pneumococcal carriage: a randomized trial. *JAMA* 2001;286:49-56.

Schuchat A, Robinson K, Wenger JD, Harrison LH, Farley M, Reingold AL, Lefkowitz L, Perkins BA. Bacterial meningitis in the United States in 1995. Active Surveillance Team. *N Engl J Med.* 1997;337:970-6.

Selander RK, Caugant DA, Ochman H, Musser JM, Gilmour MN, Whittam TS. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl Environ Microbiol*. 1986;51:873-84.

Shea KM, Weycker D, Stevenson AE, Strutton DR, Pelton SI. Modeling the decline in pneumococcal acute otitis media following the introduction of pneumococcal conjugate vaccines in the US. *Vaccine* 2011;29:8042-48.

Sibold C, Henrichsen J, König A, Martin C, Chalkley L, Hakenbeck R. Mosaic *pbp*X genes of major clones of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* have evolved from *pbp*X genes of a penicillin-sensitive Streptococcus oralis. *Mol Microbiol.* 1994;12:1013-23.

Siira L, Jalava J, Kaijalainen T, Ollgren J, Lyytikainen O, Virolainen A. Antimicrobial resistance in relation to sero- and genotypes among invasive *Streptococcus pneumoniae* in Finland, 2007-2011. *Microb Drug Resist.* 2014;20:124-30.

Simonsen L, Taylor RJ, Schuck-Paim C, Lustig R, Haber M, Klugman KP. Effect of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine on admissions to hospital 2 years after its introduction in the USA: a time series analysis. *Lancet Respir Med.* 2014;2:387-94.

Singleton R, Wenger J, Klejka JA, et al. The 13-valent pneumococcal conjugate vaccine for invasive pneumococcal disease in Alaska native children: results of a clinical trial. *Pediatr Infect Dis J.* 2013; 32:257-63.

Skovsted IC. Typing of streptococcus pneumoniae p.21-25. Pernille Landsbo Elverdal, Mette Barendorff Kerrn, Jesper Freddie Sorensen, Sanne Otte, Kurt Fuursted, Zitta Barella Harboe, and Helle Bossen Konradsen. Editors. 2nd ed. Streptococcus pneumoniae: Textbook in diagnosis, serotyping, virulence factors and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measuring pneumococcal antibodies, 2015, *Statens Serum Institut.*

Sleeman K, Knox K, George R, Miller E, Waight P, Griffiths D, Efstratiou A, Broughton K, Mayon-White RT, Moxon ER, Crook DW. Oxford Pneumococcal Surveillance Group. Invasive pneumococcal disease in England and Wales: vaccination implications. *J Infect Dis.* 2001;183:239-46.

Slotved HC, Kaltoft M, Skovsted IC, Kerrn MB, Espersen F. Simple, rapid latex agglutination test for serotyping of pneumococci (Pneumotest-Latex). *J Clin Microbiol.* 2004;42:2518-22.

Smith AM, Botha RF, Koornhof HJ, Klugman KP. Emergence of a pneumococcal clone with cephalosporin resistance and penicillin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:2648-50.

Smith AM, Klugman KP. Alterations in MurM, a cell wall muropeptide branching enzyme, increase high-level penicillin and cephalosporin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:2393-96.

Song JY, Moseley MA, Burton RL, Nahm MH. Pneumococcal vaccine and opsonic pneumococcal antibody. *J Infect Chemother.* 2013;19:412-25.

Sorensen UB. Typing of pneumococci by using 12 pooled antisera. *J Clin Microbiol.* 1993;31:2097-100.

Sorensen UB. Pneumococcal polysaccharide antigens: capsules and C-polysaccharide. An immunochemical study. *Dan Med Bull*. 1995;42:47-53.

Stamboulidis K, Chatzaki D, Poulakou G, Ioannidou S, Lebessi E, Katsarolis I, Sypsa V, Tsakanikos M, Kafetzis D, Tsolia MN. The impact of the heptavalent pneumococcal conjugate vaccine on the epidemiology of acute otitis media complicated by otorrhea. *Pediatr Infect Dis J.* 2011;30:551-55.

Stanek RJ, Mufson MA. A 20-year epidemiological study of pneumococcal meningitis. *Clin Infect Dis.* 1999;28:1265-72.

Strutton DR, Farkouh RA, Rubin JL, McGarry LJ, Loiacono PM, Klugman KP, Pelton SI, Gilmore KE, Weinstein MC. Modeling the impact of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine serotype catch-up program using United States claims data. *BMC Infect Dis.* 2012;12:175.

Syriopoulou V, Daikos GL, Soulis K, Michos A, Alexandrou H, Pavlopoulou I, Pagali IPA, Hadjichristodoulou C, Theodoridou M. Epidemiology of invasive childhood pneumococcal infections in Greece. *Acta Paediatr.* Suppl 2000;89:30-4.

Syriopoulou V, Menegas D, Georgakopoulou T, Koutouzis E, Charissiadou A, Chrysaki A, Pangalis A, Theodoridou M, Daikos GL. Pneumococcal disease in children: changing serotypes and antimicrobial resistance in a tertiary hospital in Greece (2002-2011). 8th International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases (ISPPD), Iguacu Falls, Brazil, 12-15 March 2012. Abstract 195

Syrogiannopoulos GA, Katopodis GD, Grivea IN, Beratis NG. Antimicrobial use and serotype distribution of nasopharyngeal Streptococcus pneumoniae isolates recovered from Greek children younger than 2 years old. *Clin Infect Dis.* 2002;35:1174-82.

Syrogiannopoulos GA, Michoula AN, Tsimitselis G, Vassiou K, Chryssanthopoulou DC, Grivea IN. Pneumonia with empyema among children in the first five years of high coverage with 13-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Infect Dis (Lond).* 2016:1-5.

T

Tait-Kamradt A, Davies T, Appelbaum PC, Depardieu F, Courvalin P, Petitpas J, Wondrack L, Walker A, Jacobs MR, Sutcliffe J. Two new mechanisms of macrolide resistance in clinical strains of *Streptococcus pneumoniae* from Eastern Europe and North America. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44: 3395-3401.

Takala AK, Vuopio-Varkila J, Tarkka E, Leinonen M, Musser JM. Subtyping of common pediatric pneumococcal serotypes from invasive disease and pharyngeal carriage in Finland. *J Infect Dis.* 1996;173:128-35.

Tan TQ. Pediatric invasive pneumococcal disease in the United States in the era of pneumococcal conjugate vaccines. *Clin Microbiol Rev.* 2012;25:409-19.

Tan TQ, Mason EO Jr, Barson WJ, Wald ER, Schutze GE, Bradley JS, Arditi M, Givner LB, Yogev R, Kim KS, Kaplan SL. Clinical characteristics and outcome of children with

pneumonia attributable to penicillin susceptible and penicillin-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae*. *Pediatrics* 1998;102:1369-75.

Teele DW, Klein JO, Rosner B. Epidemiology of otitis media during the first seven years of life in children in greater Boston: a prospective, cohort study. *J Infect Dis.* 1989;160:83-94.

Teele DW, Marshall R, Klein JO. Unsuspected bacteremia in young children: a common and important problem. *Pediatr Clin North Am.* 1979;26:773-84.

Toikka P, Virkki R, Mertsola J, Ashorn P, Eskola J, Ruuskanen O. Bacteremic pneumococcal pneumonia in children. *Clin Infect Dis.* 1999;29:568-72.

Tomczyk S, Bennett NM, Stoecker C, Gierke R, Moore MR, Whitney CG, Hadler S, Pilishvili T, Centers for Disease Control and Prevention. Use of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine and 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine among adults aged 65 years: recommendations of the advisory committee on immunization practices (ACIP). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2014;63:822-5.

U

Uhari M, Mantysaari K, Niemela M. A meta-analytic review of the risk factors for acute otitis media. *Clin Infect Dis.* 1996;22:1079-83.

V

Van Eldere J, Mera RM, Miller LA, Poupard JA, Amrine-Madsen H. Risk factors for development of multiple-class resistance to *Streptococcus pneumoniae* strains in Belgium over a 10-year period: antimicrobial consumption, population density, and geographic location. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:3491-7.

Vanderkooi OG, Low DE, Green K, Powis JE, McGeer A; Toronto Invasive Bacterial Disease Network. Predicting antimicrobial resistance in invasive pneumococcal infections. *Clin Infect Dis.* 2005;40:1288-97.

Vanderkooi OG, Scheifele DW, Girgenti D, Halperin SA, Patterson SD, Gruber WC, Emini EA, Scott DA, Kellner JD; Canadian PCV13 Study Group. Safety and immunogenicity of a 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in healthy infants and toddlers given with routine pediatric vaccinations in Canada. *Pediatr Infect Dis J.* 2012;31:72-7.

Varaldo PE, Montanari MP, Giovanetti E. Genetic elements responsible for erythromycin resistance in *streptococci*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53:343-53.

Varon E, Cohen R, Bechet S, Doit C, Levy C. Invasive disease potential of pneumococci before and after the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine implementation in children. *Vaccine* 2015;33:6178-85.

Vestrheim DF, Løvoll O, Aaberge IS, Caugant DA, Høiby EA, Bakke H, Bergsaker MR. Effectiveness of a 2+1 dose schedule pneumococcal conjugate vaccination programme on invasive pneumococcal disease among children in Norway. *Vaccine* 2008;26:3277-81.

Vollmer W, Blanot D, de Pedro MA. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev*. 2008;32:149-67.

Vollmer W. Structural variation in the glycan strands of bacterial peptidoglycan. *FEMS Microbiol Rev*. 2008;32:287-306.

von Gottberg A, Klugman KP, Cohen C, Wolter N, de Gouveia L, du Plessis M, Mpembe R, Quan V, Whitelaw A, Hoffmann R, Govender N, Meiring S, Smith AM, Schrag S; Group for Enteric, Respiratory and Meningeal Disease Surveillance in South Africa (GERMS-SA). Emergence of levofloxacin non-susceptible *Streptococcus pneumoniae* and treatment for multidrug resistant tuberculosis in children in South Africa: a casecontrol observational surveillance study. *Lancet* 2008;371:1108-13.

W

Walker CL, Rudan I, Liu L, Nair H, Theodoratou E, Bhutta ZA, O'Brien KL, Campbell H, Black RE. Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea. *Lancet* 2013;381:1405-16.

Wang H, Chen M, Xu Y, Sun H, Yang Q, Hu Y, Cao B, Chu Y, Liu Y, Zhang R, Yu Y, Sun Z, Zhuo C, Ni Y, Hu B, Tan TY, Hsueh PR, Wang JH, Ko WC, Chen YH, Wahjono H. Antimicrobial susceptibility of bacterial pathogens associated with community-acquired respiratory tract infections in Asia: report from the Community- Acquired Respiratory Tract Infection Pathogen Surveillance (CARTIPS) study, 2009-2010. *Int J Antimicrob Agents* 2011;38:376-83.

Waterer GW, Jennings SG, Wunderink RG. The impact of blood cultures on antibiotic therapy in pneumococcal pneumonia. *Chest* 1999;116:1278-81.

Weigel LM, Anderson GJ, Facklam RR, Tenover FC. Genetic analyses of mutations contributing to fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:3517-23.

Weil-Olivier C, van der Linden M, de Schutter I, Dagan R, Mantovani L. Prevention of pneumococcal diseases in the post-seven valent vaccine era: a European perspective. *BMC Infect Dis.* 2012;12:207.

Weinberger DM, Grant LR, Steiner CA, Weatherholtz R, Santosham M, Viboud C, O'Brien KL Seasonal drivers of pneumococcal disease incidence: impact of bacterial carriage and viral activity. *Clin Infect Dis.* 2014;58:188-94.

Weiss K, Restieri C, Gauthier R, Laverdière M, McGeer A, Davidson RJ, Kilburn L, Bast DJ, de Azavedo J, Low DE. A nosocomial outbreak of fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Infect Dis.* 2001;33:517-22.

Whitney CG, Farley MM, Hadler J, Harrison LH, Bennett NM, Lynfield R, Reingold A, Cieslak PR, Pilishvili T, Jackson D, Facklam RR, Jorgensen JH, Schuchat A. Decline in invasive pneumococcal disease after the introduction of protein-polysaccharide conjugate vaccine. *N Engl J Med.* 2003; 348:1737-46.

Whitney CG, Pilishvili T, Farley MM, Schaffner W, Craig AS, Lynfield R, Nyquist AC, Gershman KA, Vazquez M, Bennett NM, Reingold A, Thomas A, Glode MP, Zell ER, Jorgensen JH, Beall B, Schuchat A. Effectiveness of seven-valent pneumococcal conjugate vaccine against invasive pneumococcal disease: a matched case-control study. *Lancet* 2006;368:1495-1502.

Widdowson CA, Adrian PV, Klugman KP. Acquisition of chloramphenicol resistance by the linearization and integration of the entire staphylococcal plasmid pC194 into the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44:393-5.

Widdowson CA, Klugman KP, Hanslo D. Identification of the tetracycline resistance gene, tet(O), in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40: 2891-3.

Wolter N, du Plessis M, von Gottberg A, de Gouveia L, Klugman KP. Molecular characterization of emerging non-levofloxacin-susceptible pneumococci isolated from children in South Africa. *J Clin Microbiol.* 2009;47:1319-24.

Wolter N, Smith AM, Farrell DJ, Schaffner W, Moore M, Whitney CG. Novel mechanism of resistance to oxazolidinones, macrolides, and chloramphenicol in ribosomal protein L4 of the pneumococcus. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:3554-7.

Woods ER, Merola JL, Bithoney WG, Spivak H, Wise PH. Bacteremia in an ambulatory setting: improved outcome in children treated with antibiotics. *Am J Dis Child.* 1990;144:1195-9.

World Health Organization (WHO). Technical Report Series. Expert Committee on Biological Standardization. Annex 2: Recommendations for the Production and Control of Pneumococcal Conjugate Vaccines. 54th report. Geneva, Switzerland: WHO; 2005:66-89.

World Health Organization (WHO). Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization-WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec.* 2007;82:93-104.

World Health Organization (WHO). Pneumococcal vaccines WHO position paper – 2012a. *Wkly Epidemiol Rec.* 2012;7:129-44.

World Health Organization (WHO). Pneumococcal vaccines WHO position paper – 2012b - recommendations. *Vaccine* 2012;30:4717-18.

World Health Organization (WHO). Estimates of disease burden and cost effectiveness - 2015 http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance.

Wyres KL, van Tonder A, Lambertsen LM, Hakenbeck R, Parkhill J, Bentley SD, Brueggemann AB. Evidence of antimicrobial resistance-conferring genetic elements among pneumococci isolated prior to 1974. *BMC Genomics* 2013;14:500.

Y

Yagupsky P, Porat N, Fraser D, Prajgrod F, Merires M, McGee L, Klugman KP, Dagan R. Acquisition, carriage and transmission of pneumococci with decreased antibiotic susceptibility in young children attending a day-care facility in southern Israel. *J Infect Dis.* 1998;177:1003-12.

Yildirim I, Stevenson A, Hsu KK, Pelton SI. Evolving picture of invasive pneumococcal disease in Massachusetts children: a comparison of disease in 2007-2009 with earlier periods. *Pediatr Infect Dis J.* 2012;31:1016-21.

Z

Zangwill KM, Vadheim CM, Vannier AM, Hemenway LS, Greenberg DP, Ward JI. Epidemiology of invasive pneumococcal disease in southern California: implications for the design and conduct of a pneumococcal conjugate vaccine efficacy trial. *J Infect Dis.* 1996;174:752-9.

Zerfass I. Hakenbeck R. and Denapaite, D. An Important site in PBP2x of Penicillin-Resistant Clinical Isolates of *Streptococcus pneumoniae*: Mutational Analysis of Thr338. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:1107-15.

Zhanel GG, Palatnick L, Nichol KA, Bellyou T, Low DE, Hoban DJ. Antimicrobial resistance in respiratory tract *Streptococcus pneumoniae* isolates: results of the Canadian Respiratory Organism Susceptibility Study, 1997 to 2002. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:1867-74.

Zhou F, Shefer A, Kong Y, Nuorti JP. Trends in acute otitis media-related health care utilization by privately insured young children in the United States, 1997-2004. *Pediatrics* 2008;121:253-60.

Zissis NP, Syriopoulou V, Kafetzis D, Daikos GL, Tsilimingaki A, Galanakis E, Tsangaropoulou I. Serotype distribution and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* causing invasive infections and acute otitis media in children. *Eur J Pediatr.* 2004;163:364-8.

Zuccotti G, Mameli C, Daprai L, Garlaschi ML, Dilillo D, Bedogni G, Faccini M, Gramegna M, Torresani E; PneuMi Study Group (PMSG), Ballerini E, Benincaso A, Bonvissuto M, Bricalli D, Brioschi M, Calloni CS, Camiletti MI, Colella G, De Angelis L, Decarlis S, Di Nello F, Dozzi M, Galli E, Gandini V, Giuliani MG, Laviola F, Loda B, Macedoni M, Mazzucchi E, Metta MG, Moscatiello A, Nannini P, Petruzzi M, Picicco D, Picciotti M, Pisanelli S, Porta N, Ramponi G, Redaelli F, Rubini R, Sala N, Saitta V, Scelza G, Tiso RM, Tomasetto M, Torcoletti M, Travaini M, Valentini M, Vessia C. Serotype distribution and antimicrobial susceptibilities of nasopharyngeal isolates of *Streptococcus pneumoniae* from healthy children in the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine era. *Vaccine* 2014;32:527-34.